

Dt108

Rijksuniversiteit Gent
Faculteit van de Landbouwwetenschappen
Laboratorium voor Fytofarmacie

HET VERBAND TUSSEN DE SCHEIKUNDIGE STRUKTUUR
EN DE BIOLOGISCHE AKTIVITEIT BIJ
O-ALKYL-O-ARYL FENYLFOSFONOTHIOATEN

WALTER STEURBAUT

*Proefschrift voorgedragen tot het bekomen van de graad
van Doctor in de Landbouwkundige Wetenschappen
op het gezag van*

Rector Prof. Dr. A. DEVREKER

Deken :
Prof. Dr. Ir. J. STRYCKERS

Promotor :
Prof. Ir. R.H. KIPS

GENT ¹⁹⁷⁶ Rijksuniversiteit
Faculteit Landbouwwetenschappen
Centrale Bibliotheek

BIJSTELLING

Niettegenstaande de systemische werking van sommige fungiciden blijkt dit in grote mate afhankelijk te zijn van de toepassingswijze

U. S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE

REPORT OF THE COMMISSIONER OF THE GENERAL LAND OFFICE
ON THE PROGRESS OF THE LAND OFFICE DURING THE YEAR 1894

DANKWOORD

Bij het verschijnen van dit proefschrift passen enige woorden van dank aan allen die hebben bijgedragen tot de realisering ervan.

Mijn dank gaat in de eerste plaats naar mijn promotor, Prof. Ir. R.H. KIPS, die mij in de gelegenheid heeft gesteld mijn onderzoek met een doctoraats-proefschrift af te sluiten. Zijn onbaatzuchtige hulp en kritische evaluatie van het onderzoek zijn een grote steun voor mij geweest bij het uitvoeren van deze studie.

Mijn dank gaat eveneens naar Prof. Dr. N. SCHAMP, Prof. Dr. Gh. VANSTEENKISTE en Prof. Dr. J. LHOSTE voor de belangstelling waarmee zij het verloop van dit onderzoek volgden en de interesse die ze hebben getoond bij het nazien van dit proefschrift.

Mijn gevoelens van dank gaan eveneens naar de heer Dekan van de Fakulteit van de Landbouwwetenschappen, Prof. Dr. Ir. J. STRYCKERS, en naar alle professoren die bijgedragen hebben tot mijn wetenschappelijke vorming.

Zeer waardevol was de samenwerking met het "Centre de Recherches de Biologie appliquée" van de S.A. Procida (Marseille, France) waar ik onder leiding van Prof. Dr. J. LHOSTE een belangrijk deel van deze studie heb kunnen verwezenlijken. Hier weze speciaal vermeld Dr. CARLES voor de moleculaire orbitaal berekeningen en Dr. RAUCH voor de biologische proeven.

Een speciaal woord van dank richt ik tot Dr. Ir. W. DEJONCKHEERE voor de vele diepgaande discussies die ik met hem heb over dit onderzoek heb gevoerd en voor de goede samenwerking.

Het gedeelte van dit onderzoek handelend over de verschillende spektra had nooit deze omvang kunnen bereiken zonder de zeer bekwame hulp van Ir. L. SCHREYEN en Dr. Ir. N. DE KIMPE van het laboratorium voor Organische scheikunde. Ik ben hun veel dank verschuldigd voor deze samenwerking.

Verder wil ik allen die hun medewerking hebben verleend aan dit onderzoek mijn welgemeende dank betuigen, en met name ing. R. VERSTRAETEN, ing. J. CALLEWIER en wijlen A. CEDEVN (+23.2.1976).

Een bijzonder woord van lof komt toe aan Mevr. L. KIEKENS-DE HENAU en de heer H. VAN BOST voor de snelle en accurate wijze waarop zij het manuscript hebben getypt en gedrukt.

Tenslotte wil ik in het bijzonder mijn oprechte dank betuigen aan mijn ouders, voor de vele offers die hun gevraagd werden om mij toe te laten mijn studiën tot een goed einde te volbrengen en ik wens hun te betrekken in de bekroning ervan met dit doctoraatsproefschrift.

Gent, juni 1976.

III

I N H O U D S O P G A V E

Inleiding en probleemstelling	1
Deel 1 : Synthese en eigenschappen van O-alkyl-O-aryl fenylfosfonothioaten	5
Hoofdstuk I : Synthese van O-alkyl-O-aryl fenylfos- fonothioaten	7
1. Nomenclatuur van de fosforverbindingen	7
2. Algemeen overzicht van de synthese van organo- fosforverbindingen	10
3. Bespreking van de synthese van O-alkyl-O-aryl- fenylfosfonothioaten	12
4. Bespreking van de I.R.-spektra	15
5. Bespreking van de N.M.R.-spektra	19
6. Bespreking van de massa-spektra	25
Hoofdstuk II : Scheikundige eigenschappen van O-alkyl- O-aryl fenylfosfonothioaten	29
1. Elektronische structuur van organofosforver- bindingen	29
2. Belangrijkste chemische reacties	30
a. Hydrolyse	30
b. Thiono-thiolo isomerisatie	32
c. Oxydatie	32
3. De hydrolyse van O-alkyl-O-aryl fenylfosfono- thioaten	33
a. Kinetiek van de hydrolyse-reactie	33
b. Bepaling van de hydrolyse-snelheid	34
- Gaschromatografisch	35
- Spektrofotometrisch	35
- Enzymatisch	36
c. Resultaten en bespreking	36
4. De oxydatie van O-alkyl-O-aryl fenylfosfono- thioaten	47
Hoofdstuk III : Fysicochemische eigenschappen van O-alkyl-O-aryl fenylfosfonothioaten	49
1. De verdelingscoëfficiënt	49
a. Definitie	49
b. Bepalingsmethode	51
c. Resultaten en bespreking	52

IV

2. De ΔR_M -waarden	52
a. Definitie	52
b. Bepalingsmethode	54
c. Resultaten en bespreking	57
3. π_{GLC} -waarden	57
a. Definitie	57
b. Bepalingsmethoden	58
c. Resultaten en bespreking	58

Hoofdstuk IV : Biochemische eigenschappen van O-alkyl-O-aryl fenylfosfonothioaten

1. Cholinesterasen : definitie en preparaten	61
a. Acetylcholinesterase (AChE)	62
b. Cholinesterasen (ChE)	62
2. Werking van organofosforverbindingen op cholinesterasen	63
3. Kinetiek van de inhibitiereductie tussen organofosforverbindingen en cholinesterasen	66
4. Methoden voor de bepaling van cholinesterasen	68
a. Literatuuroverzicht	68
b. De Ellman-methode	70
c. Geautomatiseerde technieken	72
5. Resultaten en bespreking	76

Hoofdstuk V : Biologische eigenschappen van O-alkyl-O-aryl fenylfosfonothioaten

1. Definitie van LD_{50} -waarde	79
2. Methode voor de bepaling van LD_{50} -waarden	82
3. Resultaten en bespreking	83

Deel II : Verband tussen de chemische structuur en de biologische activiteit van O-alkyl-O-aryl fenylfosfonothioaten

Hoofdstuk I : Het lineaire vrije-energie model (Hansch methode)

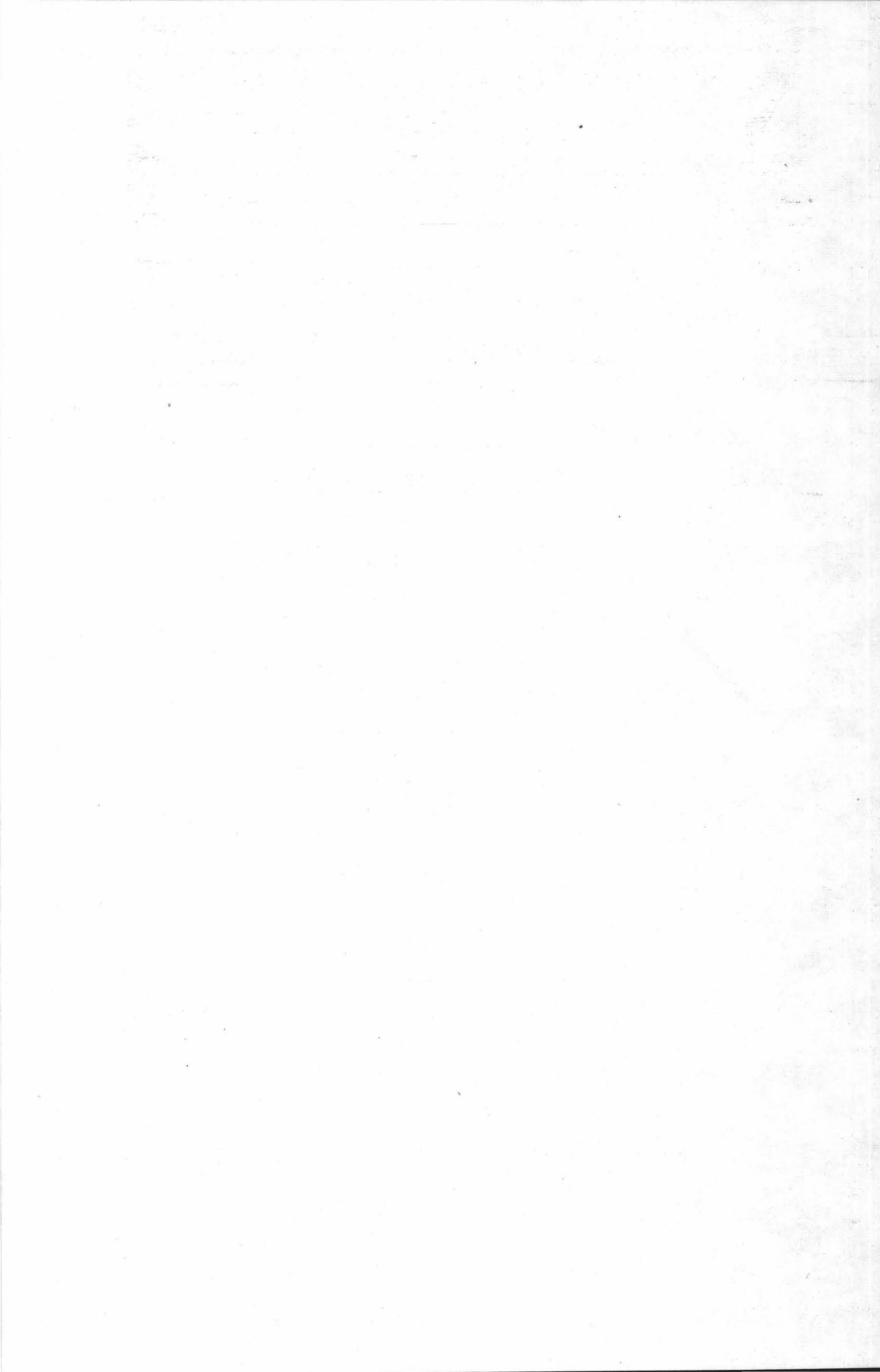
1. Opstellen van het vrije energie model	89
a. Principe	89
b. Transport van de actieve stof naar de werkingsplaats	91
c. Complexvorming van de actieve stof naar de receptor	93
d. Reactie tussen receptor en actieve moleculen in het complex	95

e. De multi-parameter vergelijking	97
2. De lineaire vrije-energie parameters	97
a. Elektronische parameters	97
b. Hydrofobe parameters	101
c. Sterische parameters	102
3. Multiple regressie analyse	105
4. Intercorrelaties tussen de verschillende parameters	108
5. Kwantitatieve structuur-aktiviteitsrelaties bij O-alkyl-O-aryl fenylfosfonothioaten	116
a. Para-gesubstitueerde R^2 -verbindingen	117
- Verband tussen de structuur en de <u>in vitro</u> -werking	117
- Verband tussen de structuur en de <u>in vivo</u> -werking	120
b. Ortho- en meta-gesubstitueerde R^2 -verbindingen	124
c. Totaalcorrelatie	126
Hoofdstuk II : Het mathematisch model volgens Free en Wilson	129
1. Opstellen van het model van Free en Wilson	129
2. Intercorrelatie van het Hansch-model met het Free en Wilson-model	131
3. Procedure	133
4. Resultaten en bespreking	136
Hoofdstuk III : Het quantum-chemisch model	143
1. Principes van de molekule-orbitaalberekeningen	143
a. De Hamilton-vergelijking	143
b. De LCAO-MO-SCF-methode	146
c. Semi-empirische π -elektron-methoden	148
- Hückel-MO-methode	148
- PPP-SCF-methode	152
d. Totaal valentie MO-methode	154
2. De structuur van acetylcholine	155
3. De structuur van de O-alkyl-O-aryl fenylfosfonothioaten	156
4. MO-indices en correlatie met de biologische activiteit	167
Deel III : Experimenteel gedeelte	175
Hoofdstuk I : Synthese van O-alkyl-O-aryl fenylfosfonothioaten	175

1. Synthesen	175
a. Bereiding van fenylfichloorfosfine (1)	175
b. Bereiding van fenylldichloorfosfonothioaat (2)	175
c. Direkte bereiding van fenylldichloorfosfonothioaat (2) volgens Jensen	175
d. Bereiding van O-ethyl fenylfosfonochlorothioaat (3)	176
e. Bereiding van O-ethyl-O-aryl fenylfosfonothioaat (4)	176
f. Direkte bereiding van O-alkyl-O-aryl fenylfosfonothioaat (4)	177
2. Zuivering van het bekomen eindreactieprodukt	178
a. Adsorptie kolomchromatografie	178
b. Preparatieve dunnelaagchromatografie	179
c. Preparatieve gaschromatografie	179
d. Hoog-vacuumbdestillatie	180
e. Herkristallisatie	180
3. Spektra	180
a. I.R.-spektra	180
b. N.M.R.-spektra	180
c. Massa-spektra	180
Hoofdstuk II : Bepaling van de chemische eigenschappen van O-alkyl-O-aryl fenylfosfonothioaten	181
1. Bepaling van de hydrolysekonstante	181
a. Gaschromatografisch	181
b. Spektrofotometrisch	182
c. Enzymatisch	183
2. Oxydatie tot het fosfonaat	183
Hoofdstuk III : Bepaling van de fysicochemische eigenschappen van O-alkyl-O-aryl fenylfosfonothioaten	185
1. Bepaling van de verdelingscoëfficiënt	185
2. Bepaling van ΔR_M -waarden	186
a. Bepaling van ΔR_M -waarden met reversed-phase dunnelaagchromatografie	186
b. Bepaling van ΔR_M -waarde met polyamide dunnelaagchromatografie	186
3. Bepaling van π_{GLC} -waarden	187
Hoofdstuk IV : Bepaling van de biologische activiteit van O-alkyl-O-aryl fenylfosfonothioaten	189

VII

1. Bereiding van enzymepreparaten	189
2. Bepaling van de I_{50} -waarde	189
3. Automatisatie voor I_{50} -waardebepalingen	190
4. Bepaling van de LD_{50} -waarden	192
Deel IV : Algemene samenvatting en besluit	193
Deel V : Literatuurlijst	197



LIJST VAN DE TABELLEN

- Tabel 1 : Overzicht van het jaarlijks aantal verbindingen dat de verschillende ontwikkelingsstadia doorloopt om één commercieel pesticide te geven.
- Tabel 2 : Overzicht en symbolen van de gesynthetiseerde moleculen.
- Tabel 3 : I.R.-gegevens.
- Tabel 4 : ^1H -N.M.R.-gegevens.
- Tabel 5 : Illustratie van het deshielding-effect door substitutie-veranderingen.
- Tabel 6 : Overzicht van enkele typische koppelingskonstanten voor fosforverbindingen.
- Tabel 7 : Fragmentatiepatroon van 4a.
- Tabel 8 : Hydrolyse-konstanten
- Tabel 9 : Halfwaarde-tijden
- Tabel 10 : Vergelijking tussen de G.L.C.-, de spektrofotometrische en de enzymatische methode voor de bepaling van de hydrolyse-konstanten.
- Tabel 11 : Bepaling van de verdelingscoëfficiënten en de π -waarden.
- Tabel 12 : R_f^- , R_M^- en ΔR_M -waarden volgens drie verschillende TLC-systemen.
- Tabel 13 : Vergelijking van de R_f -waarden bekomen volgens drie verschillende TLC-systemen.
- Tabel 14 : Gaschromatografische R_f^- en π_{GLC} -waarden op drie verschillende stationaire fazen.
- Tabel 15 : I_{50^-} en pI_{50^-} -waarden.
- Tabel 16 : LD_{50} -waarden.
- Tabel 17 : Elektronische parameters.
- Tabel 18 : Hydrofobe en sterische parameters.
- Tabel 19 : Interrelatie-matrix van de lineaire vrije-energie-konstanten.
- Tabel 20 : Correlatie-matrix van de lineaire vrije-energie konstanten en experimentele konstanten.
- Tabel 21 : Vergelijking tussen experimenteel bepaalde en berekende in vitro-inhibitie.
- Tabel 22 : Overzicht van de ρ -konstanten voor ortho-, meta- en para-substitutie.
- Tabel 23 : Strukturele matrix van de Free en Wilson-procedure.

- Tabel 24 : Verkorte matrix van de Free en Wilson-procedure.
- Tabel 25 : De de novo-konstanten van de Free en Wilson-procedure.
- Tabel 26 : Correlatie-matrix van de de novo-konstanten en de lineaire vrije-energie-konstanten.
- Tabel 27 : Omrekening van polaire naar cartesische coördinaten van 4a.
- Tabel 28 : Aanvullende interatomaire afstanden en hoeken (123).
- Tabel 29 : Resultaten van de CNDO/2 berekeningen.
- Tabel 30 : Correlatie-matrix van de M.O.-indices met lineaire vrije energieparameters en de novo-parameters.
- Tabel 31 : Samenstelling van de frakties voor kolomchromatografie.
- Tabel 32 : Fosfaatbuffer-samenstelling.
- Tabel 33 : Debiet van de pumping-tubes van de geautomatiseerde Ellman-methode.

LIJST VAN DE FIGUREN

- Figuur 1 : Algemeen reaktieschema van de belangrijkste organische fosforverbindingen.
- Figuur 2a : I.R.-spektra van 4n, 4o en 4p.
b : I.R.-spektra van 4x en 4'.
- Figuur 3 : ^1H -N.M.R.-spektra van 4m en 4y.
- Figuur 4 : Opsplitsingsmechanisme van de $(\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3)$ -methylene groep.
- Figuur 5 : Massa-spektrum van 4a.
- Figuur 6 : Hydrolyse van 4a, 4d, 4g, 4j, 4m en 4p (bij pH 7 en 60°C) bepaald volgens de gaschromatografische methode.
- Figuur 7 : Hydrolyse van para-gesubstitueerde R^2 -derivaten (bij pH 9, 60°C).
- Figuur 8 : Hydrolyse van meta-gesubstitueerde R^2 -derivaten (bij pH 9, 60°C).
- Figuur 9 : Hydrolyse van ortho-gesubstitueerde R^2 -derivaten (bij pH 9, 60°C).
- Figuur 10 : Invloed van de zuurtegraad op de hydrolyse-konstante van para-gesubstitueerde R^2 -derivaten.
- Figuur 11 : Invloed van de zuurtegraad op de hydrolyse-konstante van meta-gesubstitueerde R^2 -derivaten.
- Figuur 12 : Invloed van de zuurtegraad op de hydrolyse-konstante van ortho-gesubstitueerde R^2 -derivaten.
- Figuur 13 : Hydrolyse van 4h bij verschillende zuurtegraden.
- Figuur 14 : Oxydatie van 4x, zoals gecontroleerd door een FPD-GLC-detektor.
- Figuur 15 : Verband tussen de π_{GLC} -waarden bekomen met drie verschillende stationaire fazen.
- Figuur 16 : Inhibitiereductie van AChE door een organofosforverbinding.
- Figuur 17 : De verschillende reaktiestappen bij het inhibitieproces van AChE.
- Figuur 18 : Schematische weergave van een normale AChE-cyclus en van een inhibitiereductie.
- Figuur 19 : De AChE-aktiviteit bij verschillende inhibitorconcentraties (4v), zoals bepaald met de manuele Ellman-methode, en de grafische I_{50} -bepaling.
- Figuur 20 : Flow-diagram van automatische I_{50} -bepaling.

- Figuur 21 : Inhibitieverloop bij de geautomatiseerde Ellman-methode en de grafische I_{50} -bepaling.
- Figuur 22 : Dosis-respons kurven bij de bepaling van de LD_{50} -waarde van 41 na topische toepassingen op Musca domestica.
- a : % doding en concentratie in lineaire schaal.
- b : concentratie in logaritmische schaal.
- c : % doding in probit schaal.
- Figuur 23 : Dosis-respons kurven met eenzelfde LD_{50} -waarde doch met verschillende helling.
- Figuur 24 : Schematische voorstelling van de biologische activiteit.
- Figuur 25 : Het verband tussen de σ -konstanten en de hydrolysekonstanten van para-gesubstitueerde R^2 -derivaten.
- Figuur 26 : Het verband tussen experimenteel bepaalde en berekende hydrolysekonstanten.
- Figuur 27 : Het verband tussen ΔR_M (polyamide-aceton/water) en π .
- Figuur 28 : Het verband tussen ΔR_M (reversed phase - water/azijnzuur) en π .
- Figuur 29 : Het verband tussen experimenteel bepaalde en berekende in vitro-inhibitie.
- Figuur 30 : Het verband tussen de hydrolysekonstanten en de in vivo-aktiviteit.
- Figuur 31 : Het verband tussen de σ^- -konstanten en de in vivo-aktiviteit.
- Figuur 32 : Het verband tussen experimenteel bepaalde en berekende in vivo-aktiviteit.
- Figuur 33 : Het verband tussen experimenteel bepaalde en berekende hydrolysekonstanten volgens de Free en Wilson-methode.
- Figuur 34 : Het verband tussen de δ -konstanten en de de novo-substituentparameters.
- Figuur 35 : Hückel π -elektronenenergieniveau's van benzeen.
- Figuur 36 : Roterende bindingen in de acetylcholine-molekule.
- Figuur 37 : Berekende configuratie van acetylcholine.
- Figuur 38 : Kristalstructuur van acetylcholine volgens X-stralenanalyse.

Figuur 39 : Interatomaire afstanden van organische fosformolekullen

a : Methylparathion (121) met X-stralenanalyse.

b : Fenchloorfos (122) met X-stralenanalyse.

c : Voorgestelde structuur van 4a.

Figuur 40 : Interatomaire hoeken van organische fosformolekullen.

a : Methylparathion (121) met X-stralenanalyse.

b : Fenchloorfos (122) met X-stralenanalyse.

c : Voorgestelde structuur van 4a.

Figuur 41 : Hypothetische ruimtelijke configuratie van 4a.

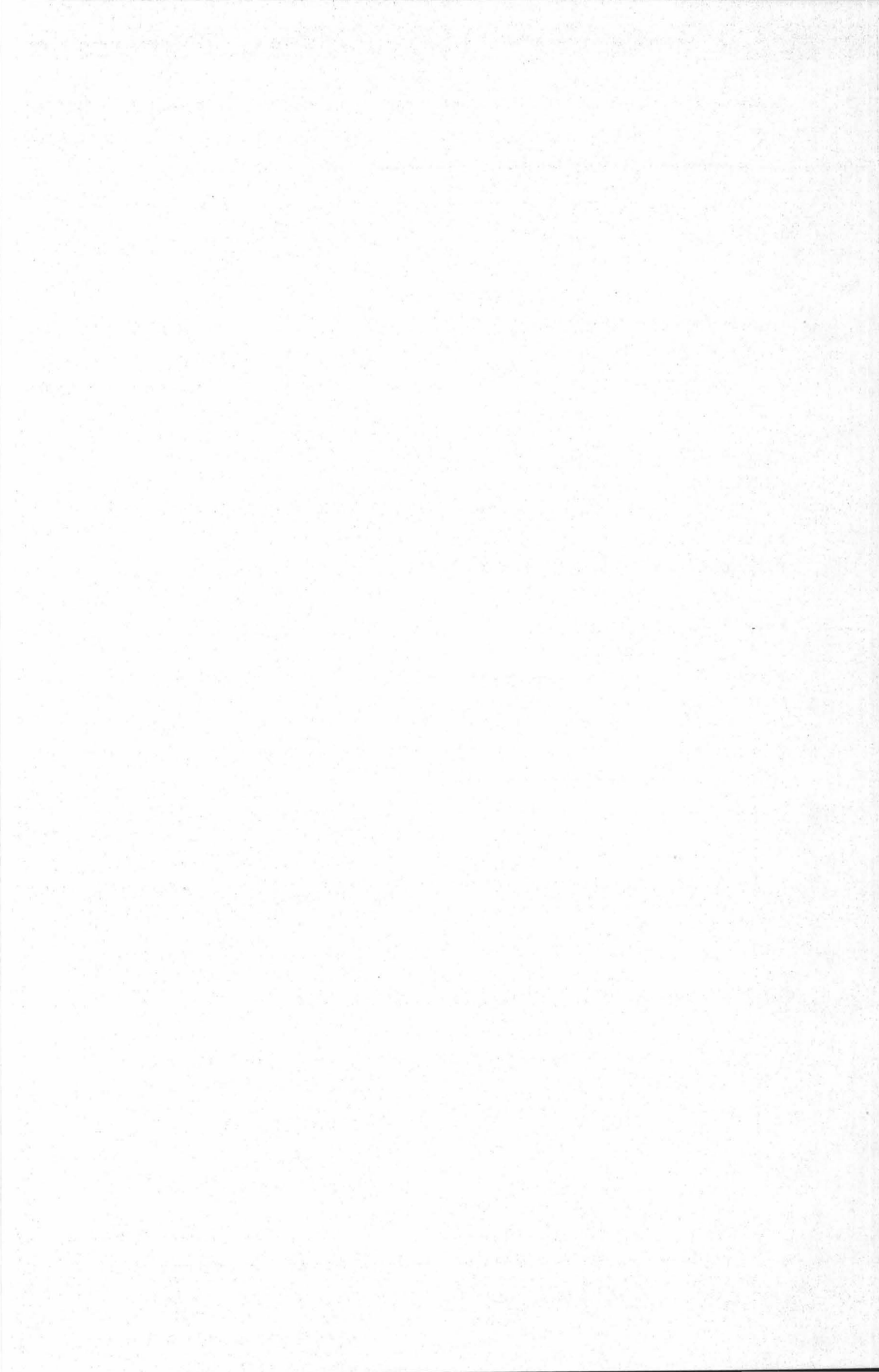
Figuur 42 : Verband tussen rotatiehoek van de benzeenring rond de C_1-O_2 -as en de totaalenergie.

Figuur 43 : De 'beste' configuratie van 4a.

Figuur 44 : De positieve ladingen op de fenoxo-ring van de O-aryl-O-ethyl-fenyl-fosfonaten.

Figuur 45 : Standaardkurve voor de bepaling van de verdelingscoëfficiënt.

Figuur 46 : Bepaling van de optimale ASChI-concentratie.



INLEIDING EN PROBLEEMSTELLING

Het rationeel gebruik van pesticiden in de landbouw is een van de belangrijkste oorzaken van de verhoogde opbrengsten van voedingswaren. Daarenboven zijn ze van groot nut geweest op het terrein van de volksgezondheid. Bestrijdingsmiddelen zijn in de huidige landbouwtechnologie onmisbaar om te komen tot een hoge produktiviteit en de vraag ernaar groeit jaarlijks met ongeveer 10 %. Een studie van Galley (1) toonde aan dat tussen 1950 en 1968 het verbruik steeg van 200 miljoen £ tot 1.230 miljoen £. Wegens de bevolkingsexplosie en het feit dat nog steeds 35 % van de oogsten vernietigd worden door insekten en plagen zal waarschijnlijk de produktie van pesticiden in de komende jaren nog verder stijgen tot een marktwaarde van meer dan 200 miljard B.F. in 1980. 10 à 15 % van deze totale produktie bestaat uit organofosforverbindingen, wat overeenkomt met meer dan 100.000 ton in 1970.

Het steeds toenemend gebruik van pesticiden geeft aanleiding tot een zekere ongerustheid en onzekerheid zowel wat betreft het gebruik zelf als de mogelijke gevolgen voor de volksgezondheid en het milieu. Vooral bepaalde persistente insekticiden zoals de organische chloorverbindingen geven problemen o.m. omdat ze akkumulieren in de voedselketen. Meer selektieve middelen zijn gewenst om ingrijpende verstoringen van het biologisch evenwicht te voorkomen. Daarenboven is ook de wetgeving voor de toelating en het gebruik van pesticiden strenger geworden om het risico voor de volksgezondheid en het milieu zo klein mogelijk te houden. Dit alles heeft voor gevolg dat de eisen voor nieuwe pesticiden veel hoger en de kosten voor de ontwikkeling ervan enorm gestegen zijn. Zo zijn de totale uitgaven voor de research en de ontwikkeling van een nieuw pesticide gestegen van 1,2 miljoen dollar in 1956 tot 2,9 miljoen dollar in 1964 en meer dan 10 miljoen dollar in 1972 (2). Dit komt vooral doordat meer verbindingen uitgetest moeten worden om één commercialiseerbaar pesticide te bekomen. Tabel 1(2) geeft een overzicht van het gemiddeld aantal verbindingen dat door de verschillende ontwikkelingsstadia moet gaan om uiteindelijk één commercieel pesticide op te leveren.

TABEL 1

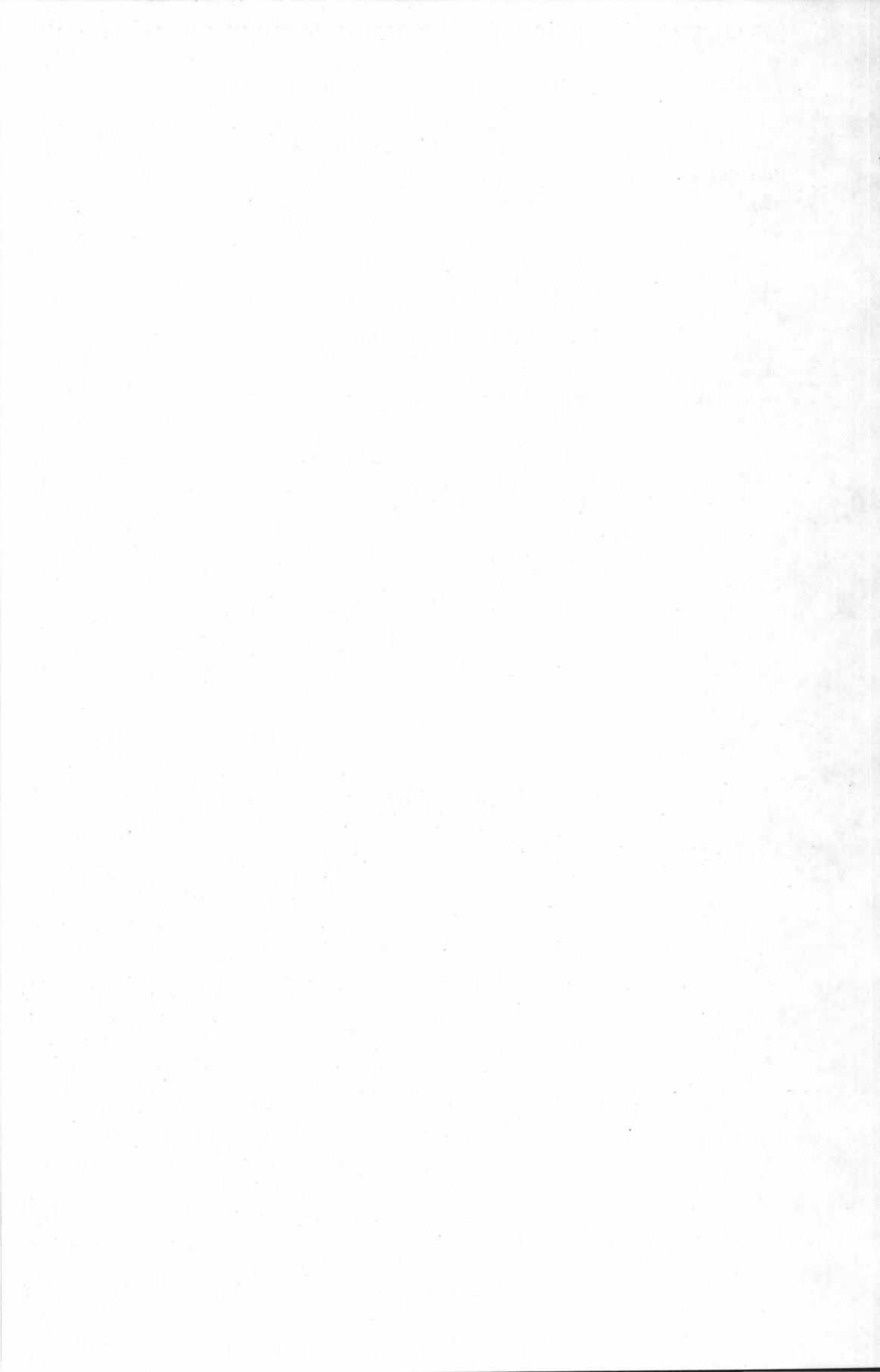
Ontwikkelingsstadium	1956	1964	1969	1970	1972
Synthese en eerste screening	1800	3600	5040	8000	10000
Gevorderde screening	60	36	126	80	N.B. [⌘]
Veldproeven	6	4	9	4	N.B.
Ontwikkeling	2	2	2	2	N.B.
Commercialisering	1	1	1	1	1

⌘ N.B. : gegevens niet beschikbaar.

De tot nu toe gecommercialiseerde pesticiden zijn ontwikkeld in uitgebreide screening-programma's die meestal uitgevoerd worden volgens het "trial and error"-principe, d.w.z. dat ganse reeksen verbindingen willekeurig worden gesynthetiseerd en uitgetest op een reeks organismen. Deze manier van werken leidde in 1972 tot het commercialiseren van slechts één pesticide op tienduizend onderzochte verbindingen. Vooral om economische redenen wordt er getracht andere, meer rationele modellen op te stellen waardoor de aktiviteit van een verbinding zou kunnen voorspeld worden aan de hand van een beperkt aantal eenvoudig te bekomen experimentele gegevens of zelfs met zuiver theoretische gegevens. Het uiteindelijk doel zou er in bestaan dat men een aktieve molekule, die voldoet aan de gestelde eisen, kan "construeren". Dit vereist een volledige kennis van de chemische structuur van de aktieve molekule en van het werkingsmechanisme op de specifieke biochemische processen in het organisme. Deze studie van de structuur-aktiviteit-relaties (SAR's), ontstaan in de zestiger jaren, heeft enorme uitbreiding genomen en heeft zich ontwikkeld tot een heel bijzondere wetenschapstak die gebaseerd is op zeer diverse disciplines : theoretische, analytische en organische scheikunde, fysica, biochemie, biologie, quantum-chemie en statistiek.

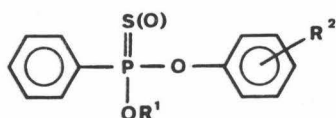
Bij de organische fosforverbindingen werden vooral de fosfaten en de thiofosfaten onderzocht op hun insekticide werking. Opvallend is dat van de honderden gecommercialiseerde organo-

fosforinsekticiden slechts een beperkt aantal fosfonaatesters zijn. Deze groep onderscheidt zich van de fosfaten door de aanwezigheid van een P-C binding. In dit werk wordt het verband nagegaan tussen de scheikundige structuur en de biologische aktiviteit van een reeks O-alkyl-O-aryl arylfosfonthioaten, dit met het doel een model te bekomen voor een meer rationele selektie van analoge aktieve verbindingen en een beter inzicht te krijgen in het werkingsmechanisme van deze verbindingen dat leidt tot een insekticide aktiviteit.



DEEL I : SYNTHESE EN EIGENSCHAPPEN VAN O-ALKYL-O-ARYL FENYL-FOSFONOTHIOATEN

In dit deel wordt een beschrijving gegeven van de synthese, de chemische, fysische, biochemische en biologische eigenschappen van een reeks O-alkyl-O-aryl fenylfosfonothioaten met volgende algemene structuur :



R^1 : $-CH_3$, $-CH_2CH_3$, $-CH_2CH_2CH_3$.

R^2 : $-H$, $-CH_3$, $-CH_2CH_3$, $-CH_2CH_2CH_3$,
 $-F$, $-Cl$, $-Br$, $-I$,
 $-OCH_3$, $-NO_2$, $-CN$.

Voor de eenvoud en de duidelijkheid werd voor elk der gesynthetiseerde O-alkyl-O-aryl fenylfosfonothioaten een symbolische voorstelling genomen als volgt :

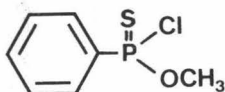
TABEL 2 : Overzicht en symbolen van de gesynthetiseerde mole-
kule

Symbool	R ¹			R ²			S of O
	-CH ₃	-C ₂ H ₅	-n-C ₃ H ₇	ortho	meta	para	
4a		x		-	-	-	S
4b		x		CH ₃	-	-	S
4c		x		-	CH ₃	-	S
4d		x		-	-	CH ₃	S
4e		x		OCH ₃	-	-	S
4f		c		-	OCH ₃	-	S
4g		x		-	-	OCH ₃	S
4h		x		Cl	-	-	S
4i		x		-	Cl	-	S
4j		x		-	-	Cl	S
4k		x		CN	-	-	S
4l		x		-	CN	-	S
4m		x		-	-	CN	S
4n		x		NO ₂	-	-	S
4o		x		-	NO ₂	-	S
4p		x		-	-	NO ₂	S
4q		x		-	-	F	S
4r		x		-	-	Br	S
4s		x		-	-	I	S
4t		x		-	-	C ₂ H ₅	S
4u		x		-	-	n-C ₃ H ₇	S
4v		x		Cl	-	Cl	S
4w		x		2,6-Cl ₂	3,5-Cl ₂	-Cl	S
4x	x			2-Cl	5-Cl	-Br	S
4y	x			-	-	CN	S
4z			x	-	-	CN	S
4'	x			2-Cl	5-Cl	-Br	O

HOOFDSTUK I : SYNTHESE VAN O-ALKYL-O-ARYL FENYLFOSFONOTHIOATEN

1. NOMENCLATUUR VAN ORGANOFOSFORVERBINDINGEN

De nomenclatuur van organische fosforverbindingen geeft dikwijls aanleiding tot grote verwarring omdat geen algemeen aanvaarde naamgeving bestaat, doch varieert naargelang het land of het onderzoeksteam. Zo vindt men bijvoorbeeld voor een verbinding met volgende structuur verschillende benamingen :



Scandinavië (3) : methoxy-phenyl-chloro-phosphinsulfid

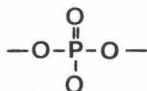
U.S.A. (Chemical abstracts) : methyl-phenyl-phosphonochloridothioate

Groot Brittannië (4) : phenyl-methoxy chlorophosphine sulfide

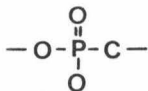
Duitsland (Beilstein) : benzyl-thio-phosphonsaure-methylesterchlorid.

De I.U.P.A.C. (International Union of Pure and Applied Chemistry) heeft getracht deze verwarrende nomenclatuur te vervangen door een algemeen aanvaardbaar en logisch systeem. De voornaamste regels zijn :

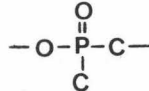
1. De essentiële groepen worden met een welbepaalde prefix genoemd :



fosforo- of
fosf....

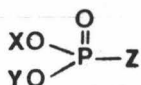


fosfono - of
fosfon....

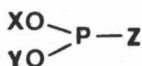


fosfino of
fosfin....

2. Voor iedere verbinding wordt dit prefix gevolgd door -aat of -iet naargelang de fosfor 5- of 3-waardig is :



fosfonaat



fosfoniet

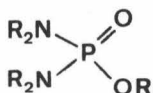
3. Indien andere atomen of functionele groepen buiten aryl- of alkyl- voorkomen, wordt de naam gevormd door inlassen van de overeenkomstige termen in het basiswoord :

fosforo - aat

- amido -
- chlorido -
- fluorido -

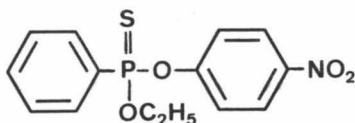
4. Bij vervanging van één of meerdere zuurstofatomen door zwavel wordt dit aangeduid door het tussenvoegsel "thio". Om de substitutieplaats te specificeren wordt dit soms vervangen door "thiono" of "thiolo" naargelang de zwavel resp. de P=O zuurstof of een P-O-C zuurstof vervangt.

5. Twee of meerdere identieke groepen worden aangeduid door de prefixen di-, tri-, enz....:



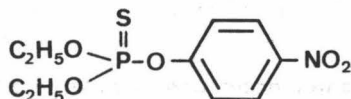
fosforodiamidoaat

6. Het laatste probleem bestaat erin de substituenten op de fosforgroep te vermelden. De substituenten X, Y, Z enz... worden vermeld met een aanduiding van het atoom waaraan ze gebonden zijn, dit om dubbelzinnige interpretatie te voorkomen:



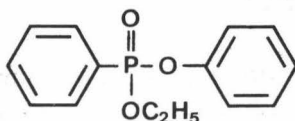
O-ethyl-O-p-nitrofenyl fenylfosfonothioaat

Soms is er slechts één enkele interpretatie mogelijk en hoeven deze plaatsaanduidingen niet vermeld te worden :



diethyl-p-nitrofenylfosforothioaat

In het geval van de fosfonaten, die een P-substituent binding hebben wordt deze meestal in één woord met de naam van de hoofdgroep vermeld.



O-ethyl-O-fenyl fenylfosfonaat

Naast de klassieke naamgeving van chemische verbindingen werd vooral gedurende de laatste jaren een totaal nieuwe manier om een chemische structuur te omschrijven ingevoerd : De Wiswesser lijn-formule notatie (WLN) (5). Bij deze notatie wordt een reeks symbolen samengevoegd overeenkomstig bepaalde stelregels zodanig dat men een kompakte, unieke en ondubbelzinnige omschrijving van de molekulen bekomt in een lineaire vorm. Deze notatie wordt vooral aangeraden bij zowel manuele als computer-indexering en -sortering.

Alhoewel de regels voor het opstellen van WLN's wel enige oefening vragen is het tamelijk eenvoudig de meeste notaties te decoderen. In principe worden lettersymbolen gebruikt om funktionele groepen voor te stellen en cijfers voor alkylketens, indien ze niet tussen haakjes staan, of voor cyclische verbindingen wanneer ze tussen haakjes geplaatst zijn. Enkele voorbeelden ter illustratie :

E, F, G, I voor resp. Br, F, Cl en I

O, P, S, N voor resp. O, P, S en N

R voor een benzeenring

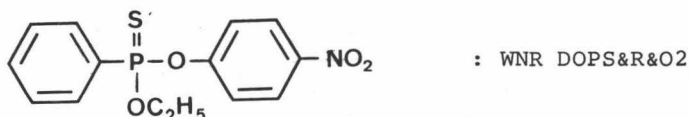
U voor een dubbele binding

W voor een niet-lineair vertakte dioxo-groep (zoals in -NO₂)

- X koolstofatoom verbonden aan vier atomen die
geen waterstof zijn
- Y koolstofatoom verbonden aan drie atomen die
geen waterstof zijn
- & wijst op het einde van een zijketen

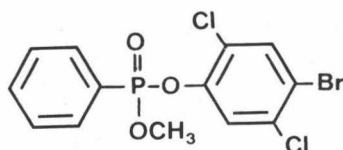
Letters voorafgegaan door een blankoruimte duiden een ring-
positie aan (A=1, B=2).

Ter illustratie geven we de WLN voor



WNR is een nitrogroep (WN) op een benzeenring (R). De D voor-
afgegaan door een blanco wijst op een D- of 4-substitutie op
de ring. De daaropvolgende reeks OPS is duidelijk. Het &-teken
duidt op vertakkingen die resp. een benzeenring (R) en een
ethoxygroep (O2) zijn.

Voor volgende verbinding is de WLN als volgt GR DG BE EO
PO&R&O1 :

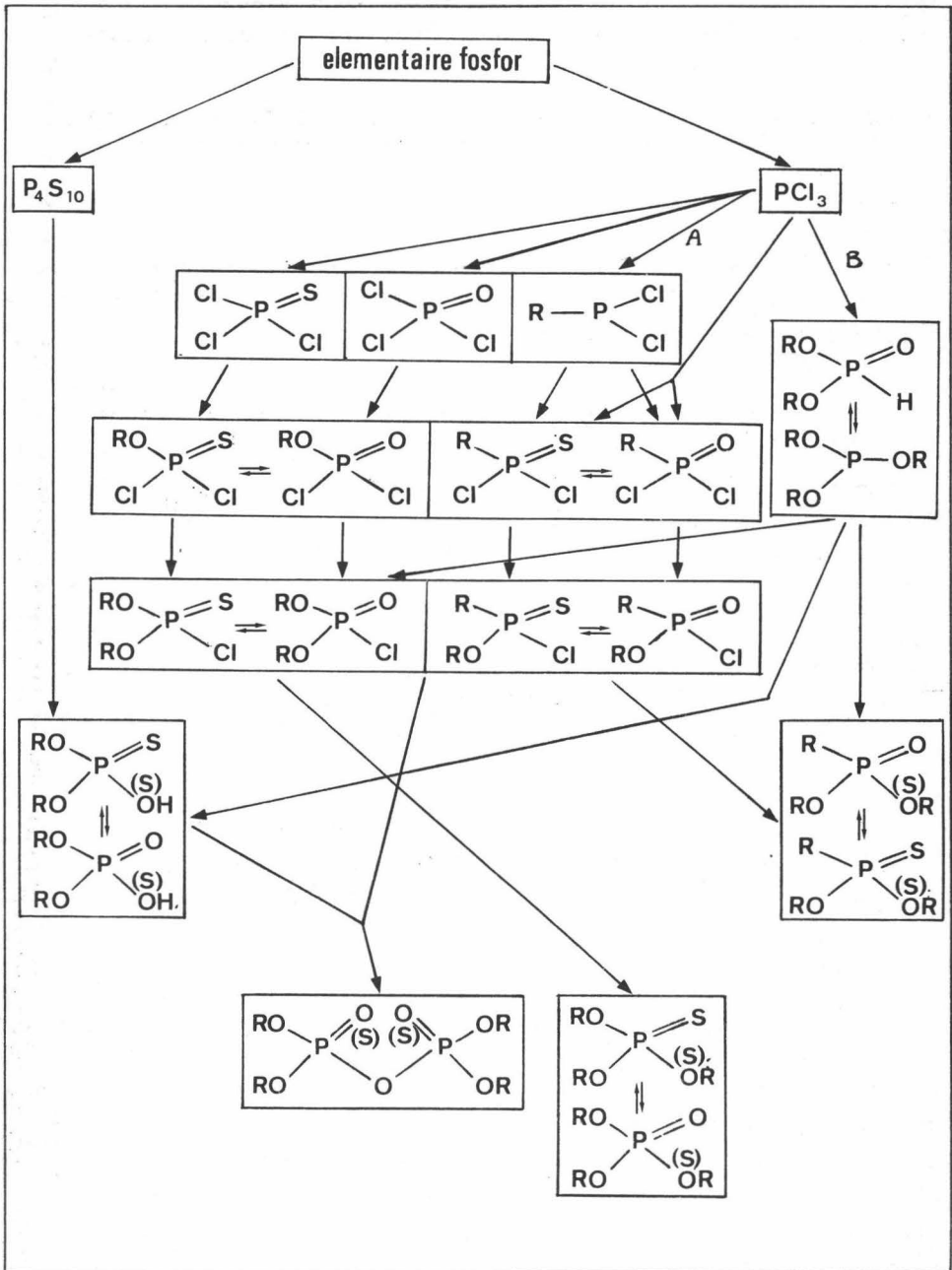


2. ALGEMEEN OVERZICHT VAN DE SYNTHESE VAN ORGANOFOSFORVER-

BINDINGEN

De ontwikkeling en de synthese van fosforzure esters is nauw
samengegaan met hun toenemend belang als insecticiden. Een
meer uitvoerige bespreking van alle reacties welke betrokken
zijn bij de synthese van organische fosforverbindingen valt
echter buiten deze studie zodat slechts een schematische weer-
gave van de belangrijkste stappen gegeven wordt in fig. 1.
Fosfonaatesters kunnen gesynthetiseerd worden op twee verschil-
lende wijzen, namelijk over het esterchloride (wijze A) of over
het trialkylfosfiet (wijze B). Voor de synthese van fosfonaten

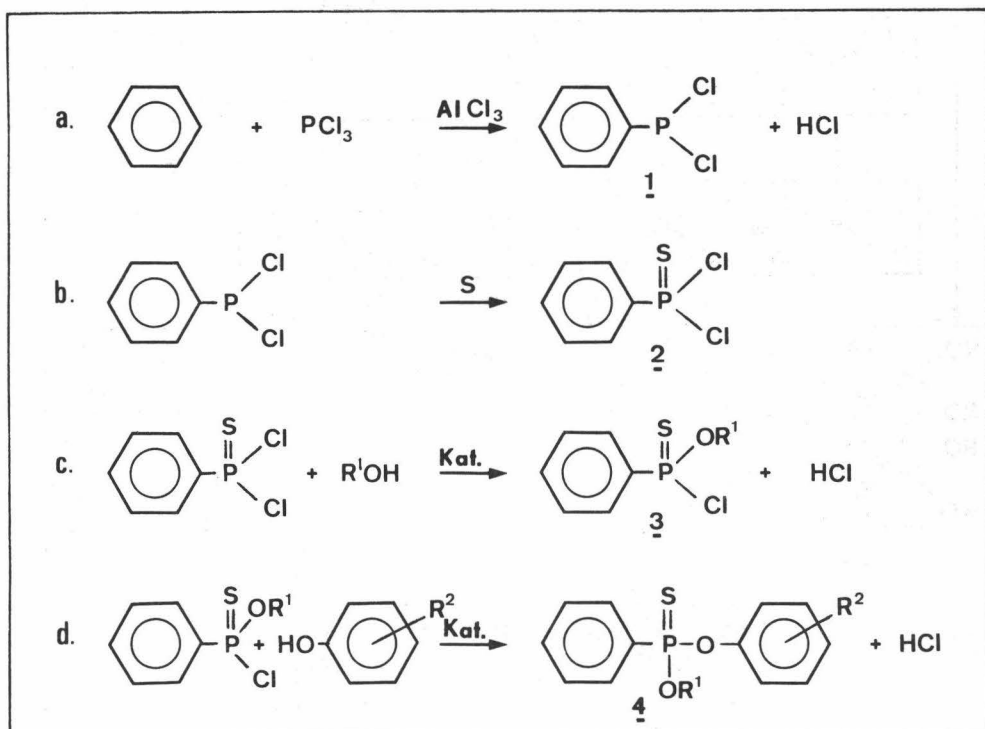
Figuur 1 : Algemeen reaktieschema van de belangrijkste organische fosforverbindingen.



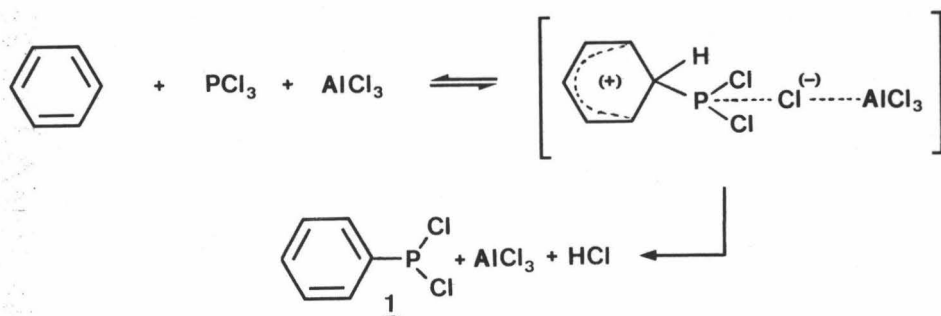
met verschillende R-groepen, zoals bij de O-alkyl-O-aryl fenylfosfonothioaten, is alleen de eerste methode mogelijk, daar de tweede slechts het inbrengen van identieke R-groepen toelaat.

3. BESPREKING VAN DE SYNTHESE VAN O-ALKYL-O-ARYL FENYLFOSFONOTHIOATEN

De in de literatuur beschreven methoden voor de synthese van O-aryl-O-alkyl arylfosfonothioaten zijn varianten van één-zelfde globaal reaktieschema :



De eerste stap (a) is een Friedel-Craft reactie van benzeen met PCl_3 in aanwezigheid van AlCl_3 tot fenyldichloorfosfine (1) (6). Het reaktieschema is als volgt :



Uit dit complex wordt het fosfine bekomen door solventextraktie.

In de tweede stap (b) wordt een zwavelatoom ingevoerd op de fosfor en men bekomt fenylfosfonodichloorthioaat (2) (7). Als verzwavelingsreagens kan naast PSCl_3 ook zwavelbloem aangewend worden.

Alhoewel deze reactie eenvoudig uit te voeren is, blijkt het rendement, vooral in de eerste stap, laag te zijn door het moeilijk isoleren van het fosfine uit het reaktiemengsel waarin het een zeer stabiel complex vormt met het aluminiumchloride. Extraktie met solventen zoals petroleum-ether en n-hexaan geven wel een zuiver produkt doch een laag rendement. Een andere methode bestaat erin het complex te hydrolyseren met een overmaat aan water, doch het rendement is nog lager daar aromatische chloorfosfinen zeer snel hydrolyseren tot het corresponderend fosfonzuur.

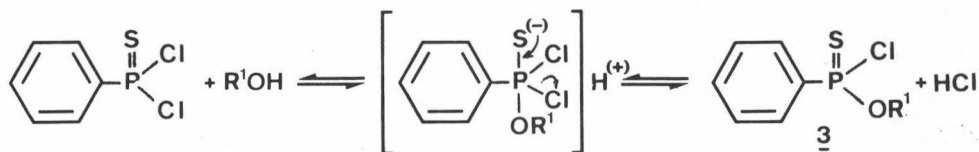
Om dit probleem te omzeilen stelde Jensen (8) voor de eerste twee stappen successief uit te voeren zonder afzondering van de reactieprodukten. Het bleek dat de sulfurisatie van het fosfine gekatalyseerd werd door kleine hoeveelheden van een polyvalent metaalhalide. Deze tweestapsreactie bood bovendien nog andere voordelen :

1. De gekende verzwavelingsmethodes met elementaire zwavel vergen een zo hoge temperatuur (150°C) dat de reactie dikwijls zeer hevig wordt en de temperatuur oploopt tot 200°C bij het plots intreden van de exothermische reactie. Door het katalyserend effect van AlCl_3 verloopt de reactie echter veel zachter en zijn geen hoge temperaturen vereist.

2. Men vermijdt de isolatie van de zeer toxische en slechteruikende fenylfosfines.

3. Het fenylfosfonodichloorthionaat kan wel gemakkelijk en met hoog rendement geïsoleerd worden uit het bekomen reaktiemengsel door hydrolyse, daar het veel stabiel is.

De derde stap (c) is een verestering met een equimoleculaire hoeveelheid alcohol tot O-alkyl-fenylfosfonochloorthioaat (9, 10).



Om deze evenwichtsreactie naar rechts te doen verschuiven moet chloorwaterstofzuur aan het reaktiemengsel onttrokken worden. De keuze van het HCl-bindend middel is belangrijk aangezien dit een invloed heeft op de reaktiesnelheid. Bij traag verloop kan immers een competitieve nevenreactie optreden die erg nadelig is voor het rendement en grote scheidingsproblemen schept nl. de reactie van het reeds gevormde O-alkyl fenylfosfonochlorothionaat met het nog vrije alcohol tot O,O-dialkyl fenylfosfonothioaat :



Verschillende produkten werden hiervoor onderzocht zoals natriumcarbonaat, triethylamine, dimethylamine, pyridine en 2-methyl-5-ethylpyridine.

De vierde stap (d) is eveneens een bimoleculaire substitutie waarbij het resterend chlooratoom vervangen wordt door een gesubstitueerd fenol (10). Ook hier moet een HCl-onttrekkend middel toegevoegd worden. De laatste twee reaktiestappen kunnen ook successieef uitgevoerd worden door eerst equimoleculaire hoeveelheden fenylfosfonodichloorthioaat en

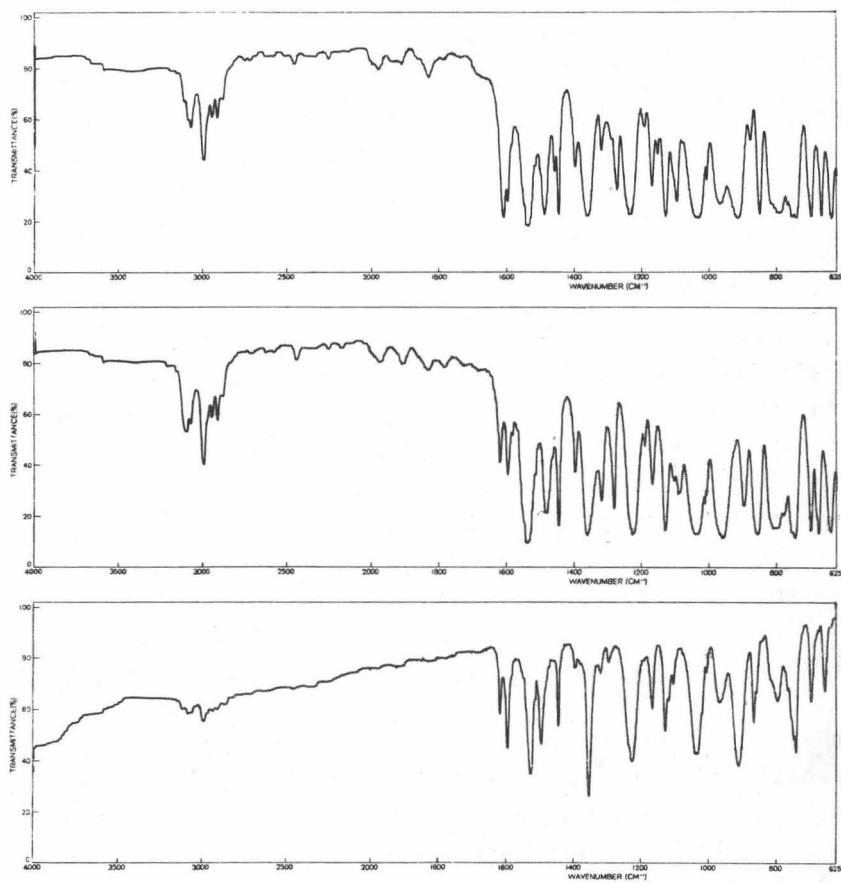
alkohol te laten reageren gevolgd door behandeling van het bekomen reaktiemengsel met een equimoleculaire hoeveelheid gesubstitueerd fenol (11). Hier bleek triethylamine het beste HCl-onttrekkend middel. De eindprodukten worden gezuiverd, indien mogelijk door kristallisatie of door hoogvacuumdestillatie, en, wegens het thermolabiel karakter van sommige van deze verbindingen, door een combinatie van kolomchromatografie en preparatieve dunnelaagchromatografie. Tabel 3 geeft een overzicht van de gesynthetiseerde produkten.

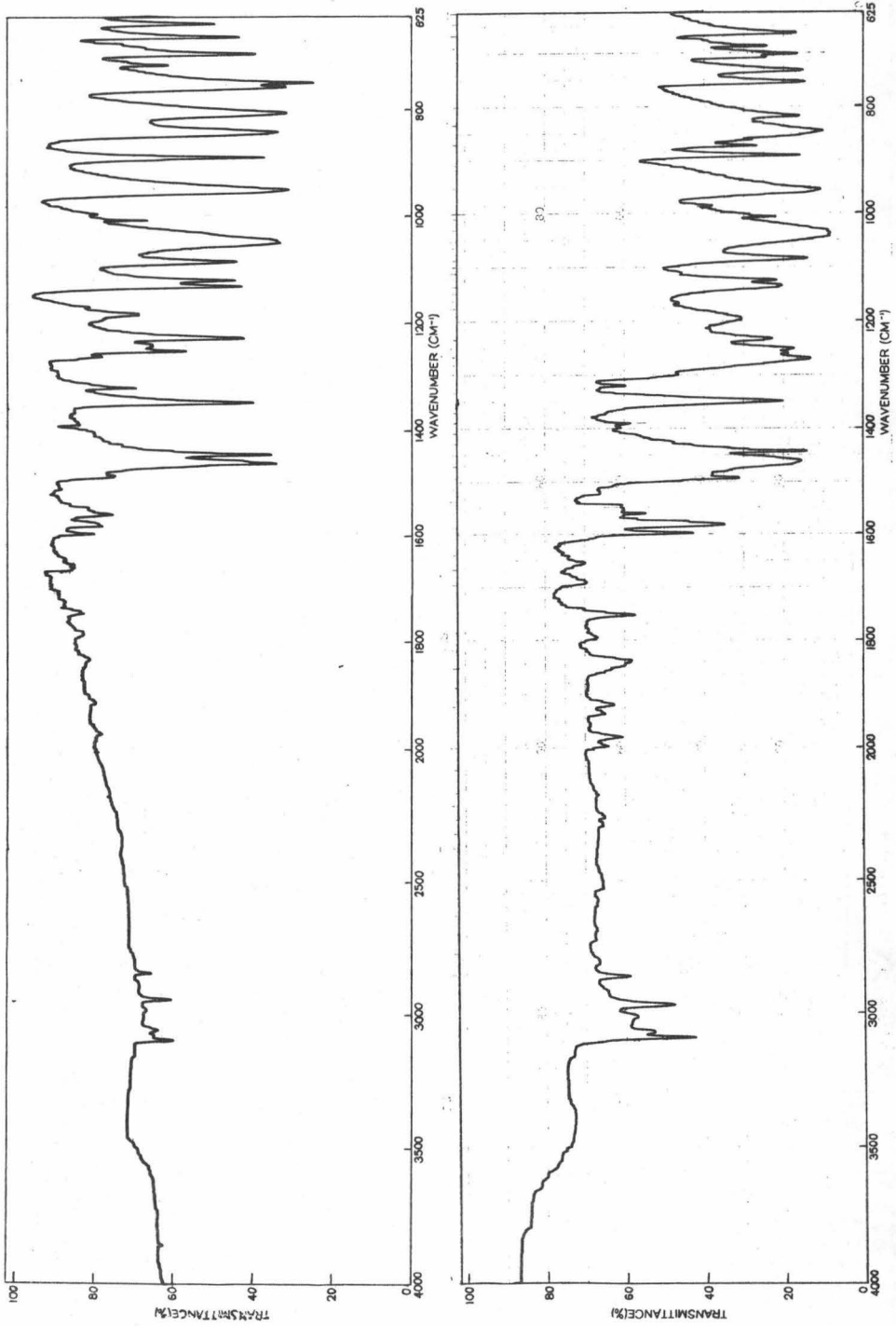
4. BESPREKING VAN DE I.R.-SPECTRA

De I.R.-gegevens zijn samengevat in tabel 3. Ter illustratie zijn de spectra van o-, m- en p-nitro derivaat (4n, 4o, 4p) weergegeven in fig. 2a en van 4x en het oxon 4' in fig. 2b. Enkele typische vibraties zijn kenmerkend voor deze reeks fosfonaten, nl. $\text{P-O-C}_{\text{alkyl}}$, $\text{P-C}_{\text{aromatisch}}$ en $\text{P-O-C}_{\text{aromatisch}}$. De P-O-Et-vibratie (1° kolom) geeft een absorptie tussen 1162 en 1172 cm^{-1} ; daartegenover is de P-O-Me-vibratie gelegen bij een hoger golfgetal (1173-1195 cm^{-1}). Een zeer gelokaliseerde absorptie voor de $\text{P-C}_{\text{aromatisch}}$ -vibratie is aanwezig bij 1444-1445 cm^{-1} . $\text{P-O-C}_{\text{aromatisch}}$ -absorpties worden echter weergevonden in een breed gebied tussen 1200 en 1240 cm^{-1} , dit afhankelijk van het substituent R^2 . De aromatische C-H stretching vibraties zijn aanwezig bij 3020-3100 cm^{-1} . Andere vibraties die specifiek zijn voor bepaalde substituenten zijn vermeld in de laatste kolom van tabel 3.

O'Brien (12) constateerde een zekere tegenstrijdigheid in deze $\text{P-O-C}_{\text{aromatisch}}$ -frekwenties. In feite zou men verwachten dat er meer elektronen zouden weggetrokken worden van de P-O- \emptyset binding naarmate de fenylgroep meer elektrofiel wordt. Dit zou moeten leiden tot een verzwakking van de binding en dus tot een verlaging van de frekwentie. Ingraham (13) stelde dit trouwens ook experimenteel vast bij de O-H stretching frekwenties van gesubstitueerde fenolen, dit in tegenstelling met de waarnemingen van Fukuto en Metcalf (14) en de resultaten in deze studie waar de P-O- \emptyset stretching frekwentie verhoogt naarmate het gesubstitueerd fenol elektrofieler wordt.

Figuur 2a : I.R.-spektra van 4n, 4o en 4p



2b : I.R.-spektra van 4x en 4'

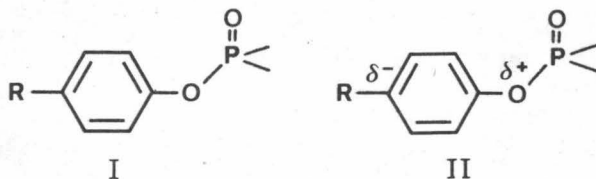
TABEL 3 : I.R.-gegevens

Ver- binding 1	R ₁	R ₂	smelt- punt °C	P-O-Et cm ⁻¹	P-C _{arom} cm ⁻¹	P-O-C _{arom} cm ⁻¹	Andere cm ⁻¹
a	Et	H		1169 (m) ^x	1445 (s)	1210 (vs)	
b	Et	2-CH ₃		1165 (w)	1444 (s)	1231 (vs)	
c	Et	3-CH ₃		1165 (w)	1446 (s)	1208 (vs)	
d	Et	4-CH ₃		1170 (s)	1445 (s)	1208 (vs)	
e	Et	2-OCH ₃		1168 (w)	1444 (s)	1209 (vs)	OMe : 2842 (m)
f	Et	3-OCH ₃		1167 (w)	1443 (s)	1200 (vs)	OMe : 2842 (m)
g	Et	4-OCH ₃		1167 (m)	1445 (s)	1205 (vs)	OMe : 2840 (m)
h	Et	2-Cl		1168 (m)	1445-1452 (s) ^{xx}	1231 (vs)	
i	Et	3-Cl		1164 (m)	1432-1443 (s) ^{xx}	1210 (vs)	
j	Et	4-Cl		1168 (s)	1446 (s)	1218 (vs)	
k	Et	2-CN	47	1163 (m)	1441-1453 (s) ^{xx}	1232 (vs)	CN = 2230 (s)
l	Et	3-CN		1154 (w)	1430-1445 (s) ^{xx}	1212 (vs)	CN = 2240 (s)
m	Et	4-CN	95	1171 (s)	1446 (s)	1222 (vs)	CN = 2242 (s)
n	Et	2-NO ₂		1169 (m)	1446 (s)	1234 (vs)	NO ₂ = 1538 (vs) 1360 (vs)
o	Et	3-NO ₂		1168 (m)	1445 (s)	1228 (vs)	NO ₂ = 1530 (vs) 1360 (vs)
p	Et	4-NO ₂	36	1168 (m)	1445 (s)	1224 (vs)	NO ₂ = 1528 (vs) 1352 (vs)
q	Et	4-F		1169 (w)	1446 (s)	1200 (vs)	
r	Et	4-Br		1168 (w)	1442 (s)	1212 (vs)	
s	Et	4-I		1172 (s)	1445 (s)	1215 (vs)	
t	Et	4-Et		1171 (m)	1445 (s)	1212 (vs)	
u	Et	4-n-prop		1172 (m)	1445 (s)	1210 (vs)	
v	Et	2,4 di-Cl		1166 (m)	1444 (s)	1235 (s)	
w	Et	2,3,4,5,6-penta- Cl	120	1162 (w)	1448 (s)	--	
x	Me	2,5 di-Cl,4-Br	70	--	1445 (s)	1228 (s)	(P)-O-Me = 1182 (m)
y	Me	4-CN	58	--	1444 (s)	1223 (vs)	(P)-O-Me = 1173 (s) CN = 2240 (s)
z	n-prop	4-CN		--	1444 (s)	1223 (vs)	(P)-O-prop = 1030 (vs)
4'	Me	2,5 di-Cl,4-Br oxon (P=O)			1443 (s)	1232 (vs)	(P)-O-Me = 1195 (m)

^x w = zwak m = medium s = sterk vs = zeer sterk (breed)

^{xx} doublet van pieken

Deze schijnbare anomalie kan echter verklaard worden als volgt : de waargenomen frekventie is in feite afkomstig van de fenyl-zuurstof stretching en niet van de P-O- \emptyset stretching-vibratie. Met deze restrictie kan dus afgeleid worden dat bij groter wordende elektrofiële eigenschappen van de substituent R in structuur I, de kans groter wordt tot vorming van structuur II :



Structuur II zou dan de fenyl-zuurstofbinding sterker maken wegens verhoogde resonantie en de stretching-frekventie verhogen. Terzelfdertijd zou de O-P binding zwakker worden zodat snellere hydrolyse optreedt in basisch milieu.

Het I.R. spectrum van 4x en 4', resp. een P=S en een P=O analoog toont, zoals afgebeeld in fig. 2b, een sterke absorptie bij 1270 cm^{-1} voor het P=O derivaat, terwijl het P=S derivaat geen absorptie vertoont in dit gebied. Dit is te wijten aan de sterke P=O stretching vibraties bij deze golflengte (15).

5. BESPREKING VAN DE N.M.R.-SPECTRA

De NMR-spectra zijn samengevat in tabel 4 en worden geïllustreerd door fig. 3 voor resp. O-methyl-O-4-cyanofenyl fenylfosfonothioaat (4y) en O-ethyl-O-4-cyanofenyl fenylfosfonothioaat (4m).

Vooreerst dient opgemerkt dat pentavalente fosforverbindingen opvallende en soms op het eerste zicht eigenaardige spectra geven, te wijten aan de spintoestand ($I = 1/2$) van ^{31}P .

De P-O-ethylverbindingen zijn gekenmerkt door een triplet van de methylgroep en een paar kwartetten van de methyleengroep, daar waar normaal een enkelvoudig kwartet kon verwacht worden, doch wegens interacties van de C-H binding met het ^{31}P -atoom kan een verandering in multipliciteit van de spectraallijnen

TABEL 4 : $^1\text{H-N.M.R.}$ -gegevens

Ver- binding	P-O-C-CH ₃	P-O-CH ₂ -C	P-O-Ø			Andere			
4	δ	δ	δ	M	J	Subst.	δ	M	J
a	1,30 ¹	4,21 ²	6,8-7,2	5(mult.)					
b	1,26	4,17	6,8-7,1	4(mult.)		2-CH ₃	2,16	3(d) ³	2,0
c	1,30	4,19	6,4-7,2	4(mult.)		3-CH ₃	2,23	3(d)	2,0
d	1,30	4,18	6,94	4(s broad)		4-CH ₃	2,25	3(d)	1,5
e	1,30	4,25	6,6-7,2	4(mult.)		2-OCH ₃	3,58	3(s) ³	
f	1,26	4,18	6,4-7,2	4(mult.)		3-OCH ₃	3,59	3(s)	
g	1,23	4,15	6,67(o) ⁴	2(d)	J _{HH} = 9,0	4-OCH ₃	3,57	3(s)	
			6,93(m) ⁴	2(dxd)	J _{HH} = 9,0 J _{PH} = 1,5				
h	1,31	4,28	6,8-7,4	4(mult.)					
i	1,28	4,20	6,7-7,3	4(mult.)					
j	1,31	4,20	7,0(o)	2(dxd)	J _{HH} = 9,5 J _{PH} = 1,5 J _{HH} = 9,5				
			7,18(m)	2(d)					
k	1,34	4,32	7,0-7,4	4(mult.)					
l	1,34	4,25	7,35	4(s)					
m	1,34	4,27	7,15(o)	2(xd)	J _{HH} = 9,0 J _{PH} = 2,0 J _{HH} = 9,0				
			7,57(m)	2(d)					
n	1,26	4,21	7,0-8,2	4(mult.)					
o	1,34	4,26	7,0-8,2	4(mult.)					
p	1,36	4,26	7,18(o)	2(dxd)	J _{HH} = 8,0 J _{PH} = 2,0 J _{HH} = 8,0 J _{HH} = 7,0				
q	1,30	4,20	8,15(m)	2(d)	J _{HH} = 9,0 J _{HH} = 9,0 J _{PH} = 2,0 J _{HH} = 9,0				
			6,90(o)	2(d)					
r	1,33	4,18	7,50(m)	2(d)	J _{HH} = 9,0 J _{HH} = 9,0 J _{PH} = 2,0 J _{HH} = 9,0				
			6,90(o)	2(dxd)					
s	1,31	4,22	7,31(m)	2(d)	J _{HH} = 9,0 J _{HH} = 9,0 J _{PH} = 1,5 J _{HH} = 9,0				
			6,83(o)	2(dxd)					
t	1,27 ⁵	4,19	6,99	4(s)		C-C-CH ₃	1,15	3(t ³)	7
			6,99	4(s)		C-CH ₂ -C	2,55	2(q ³)	7
u	1,26	4,19	6,98	4(s)		C-C-C-CH ₃	0,87	3(t)	6,5
						C-C-CH ₂ -C	1,55	2(sext.)	10
v	1,30	4,26	7,09(o)	1(dxd)	J _{HH} = 8,0 J _{PH} = 1,5 J _{HH} = 8,0(ortho) J _{HH} = 1,0(meta)	C-CH ₂ -C-C	2,50	2(t ⁶)	7
			7,18 ⁷	1(dxd)					
			7,36 ⁸	1(s) ⁹					
w	1,36	4,36							
x			7,37(o)	1(d)	J _{PH} = 1,5	P-O-CH ₃	3,89	3(d)	14,0
			7,66(m)	1(s)					
			7,13(o)	2(dxd)	J _{HH} = 9,0 J _{PH} = 1,5 J _{HH} = 9,0 J _{HH} = 9,0	P-O-CH ₃	3,78	3(d)	13,0
			7,48(m)	2(d)		P-O-C-C-CH ₃	0,95	3(t)	7,0
z		4,13	7,14(o)	2(dxd)	J _{HH} = 9,0 J _{PH} = 1,5 J _{HH} = 9,0	P-O-CH ₂ -C	1,72	2(sext.)	6,5
			7,56(m)	2(d)					
			7,63(m)	1(s)					
4'			7,68(o)	1(d)	J _{PH} = 1,5	P-O-CH ₃	3,88	3(d)	10,5

1 M = 3(triplet), J_{HH} = 72 M = 2(paar kwartetten), J_{HH} = 7, J_{PH} = 10

3 d = doublet s = singlet t = triplet q = quartet

4 o = ortho = meta

5 Beide tripletten overlappen elkaar, zodat ze lijken op een kwartet

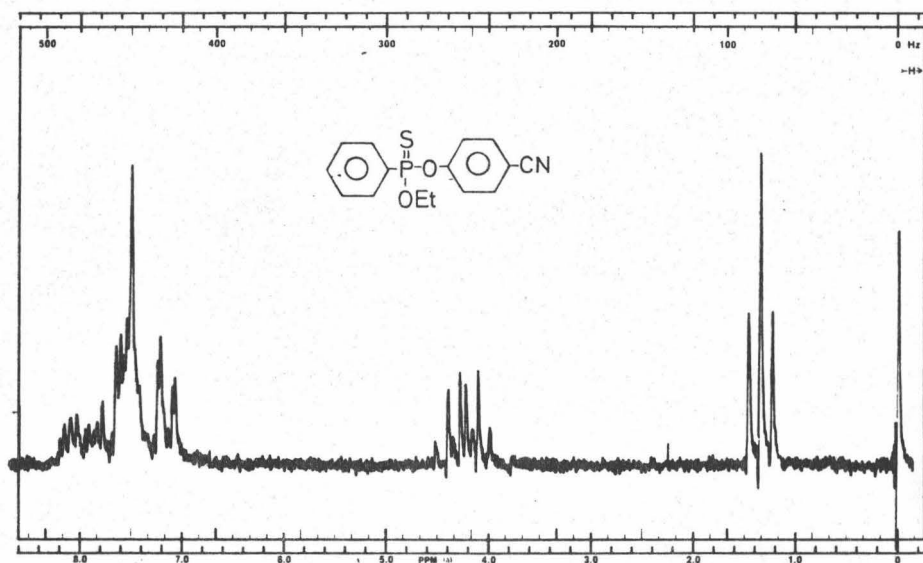
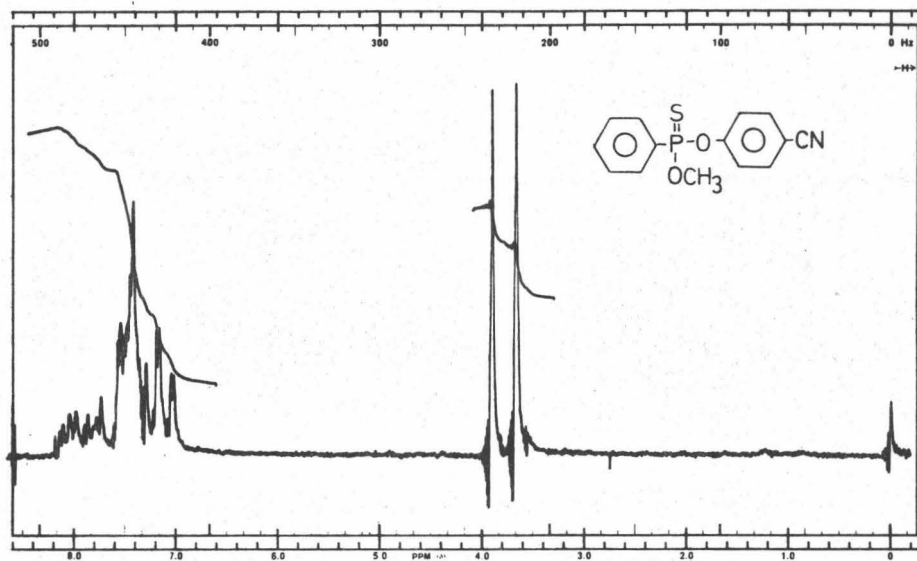
6 Geen goede resolutie, te wijten aan een "long range"-koppeling (J ~ 0,5 Hz)

7 P-O-C=C-CH=

8 P-O-C=CCl-CH=

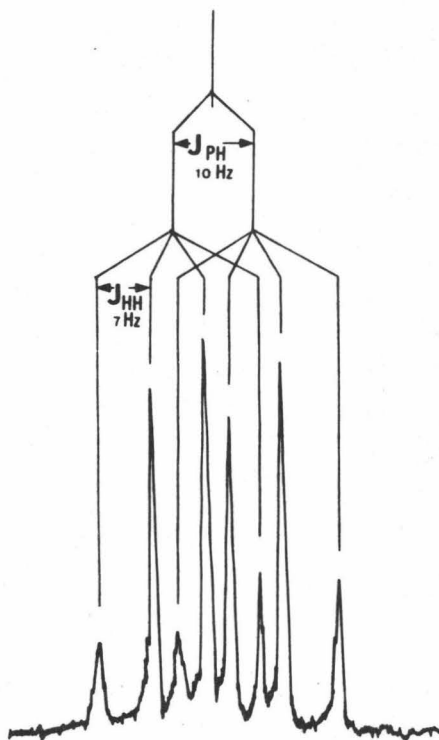
9 Breed (perturbatie)

Figuur 3 : ^1H -N.M.R.-spektra van 4m en 4y.



van enkelvoudige groepen optreden. Zo geeft de koppeling (J_{PH}) van de fosforkern met protonen van de methyleengroep aanleiding tot opsplitsing in twee lijnen van gelijke intensiteit en deze signalen worden dan verder opgesplitst door de drie methylprotonen tot een paar kwartetten zoals in fig. 4.

Figuur 4 : Opsplitsingsmechanisme van $(P-O-\underline{CH}_2-CH_3)$ -methyleengroep.



De δ -waarde van deze methyleenprotonen varieert van 4.15 tot 4.36 ppm. Er is geen direct verband tussen deze waarde en de aromatische substitutie alhoewel een 'deshielding effect' optreedt voor nitro-substitutie ($\delta_o > \delta_m > \delta_p$), terwijl het tegenovergestelde gebeurt voor methoxy-substitutie.

De koppeling tussen de protonen (J_{HH}) is ongeveer 7 Hz, terwijl de P-H koppeling een hogere waarde heeft ($J_{PH} = 10$ Hz). De δ -waarde van het methyltriplet is gelegen bij 1.26 tot 1.36. Ook hier blijkt enige invloed aanwezig van de substituenten op de arylgroep. Een toenemend 'deshielding effect' treedt op bij substitutieverandering van ortho over meta naar para in het geval van methyl- en nitrosubstitutie, dit in tegenstelling met de methoxysubstitutie terwijl cyanosubstitutie geen invloed heeft, zoals geïllustreerd in tabel 5.

TABEL 5 : Illustratie van het 'deshielding-effect' door substitutieveranderingen

	NO ₂	CH ₃	CN	OCH ₃
ortho	1.26	1.26	1.34	1.30
meta	1.34	1.30	1.34	1.26
para	1.36	1.30	1.34	1.23

De O-methyl-O-aryl fenylfosfonothioaten hebben een karakteristiek dublet voor de methylgroep bij 3.78-3.88 ppm met een hoge koppelingskonstante (14 Hz) veroorzaakt door de koppeling van ³¹P met de methylprotonen.

Het opsplitsingspatroon van de aromatische protonen is nogal gecompliceerd wegens het overlappen van de twee aromatische delen in de molekule. Interessante gegevens biedt het spectrum van het 2,3,4,5,6-pentachoorderivaat (4w) omdat het multiplet van de P-fenylgroep niet gestoord wordt door protonen van de P-O-gesubstitueerde fenylgroep. Het opsplitsingspatroon bestaat uit twee goed gescheiden multipletten : het eerste bij 7.2-7.6 ppm voor de ortho- en para-protonen, en het tweede bij 7.75-8.3 ppm voor de meta-protonen. Eliminatie van deze multipletten in de andere spectra kan dus een vereenvoudiging zijn ter verklaring van de P-O-arylprotonen. Alleen voor para-substitutie (behalve bij p-alkylderivaten) werd een P-H koppeling waargenomen aan de ortho-protonen van de P-O-arylgroep. Deze koppeling over vier bindingen had een waarde van 1.5 Hz. Koppeling over vijf bindingen werd niet waargenomen en ortho- of

meta-substitutie gaf een multiplet waarin geen duidelijke koppelingskonstanten konden aangetoond worden.

De P=O analoog (4') vertoonde een veel kleinere koppelingskonstante tussen P en methylprotonen ($J_{PH} = 10.5$ Hz). Deze koppelingskonstanten blijken onafhankelijk te zijn van het verbindingssatoom tussen het protonendragend koolstofatoom en het fosforatoom (P-O-CH₃ of P-S-CH₃) doch zeer afhankelijk van de aard van het atoom dat coördinatief gebonden is op het fosforatoom (P=S of P=O) zoals aangetoond in tabel 6.

TABEL 6 : Overzicht van enkele typische koppelingskonstanten van fosforverbindingen

$$\begin{array}{c}
 \text{—O—} \quad \text{X} \\
 \quad \quad \parallel \\
 \text{—Y—} \text{P—OR}
 \end{array}$$

X	Y	J_{PH} voor R = -CH ₃	J_{PH} voor R = -CH ₂ -CH ₃
O	O	11.0 - 11.5	9.0
O	S	11.5	9.0
O	C	10.5 - 11.0	9.0
S	O	14.0 - 14.5	10.0 - 11.5
S	S	15.5 - 16.0	10.0 - 10.5
S	C	14.0	10.5

Hieruit blijkt dat de P-H koppelingskonstante een zeer bruikbare hulp kan zijn bij de structuurbepaling van organische fosforverbindingen. De J_{PH} -waarden worden kleiner naarmate de afstand tussen het proton en het fosforatoom groter wordt. Uit eigen spectra en literatuurgegevens (16) werden volgende waarden gevonden :

P - H	470 - 480 Hz
P - O - H	250 Hz
P - O - C - H	7 - 16 Hz
P - O - C - C - H	0 - 3 Hz

6. BESPREKING VAN DE MASSA-SPEKTRA

Het massaspektrum van de ongesubstitueerde molekulen 4a is afgebeeld in figuur 5 en het fragmentatiepatroon (tabel 7) kan als basis genomen worden voor dat van de ganse reeks gesubstitueerde verbindingen waarbij de Biemann-verschuivingsregel van toepassing is. Volgens deze regel tellen, in een analoge reeks verbindingen, alleen déze brokstukken waarop een R-substituent voorkomt (R-H) massa-eenheden méér, terwijl alle andere brokstukken ongewijzigd teruggevonden worden.

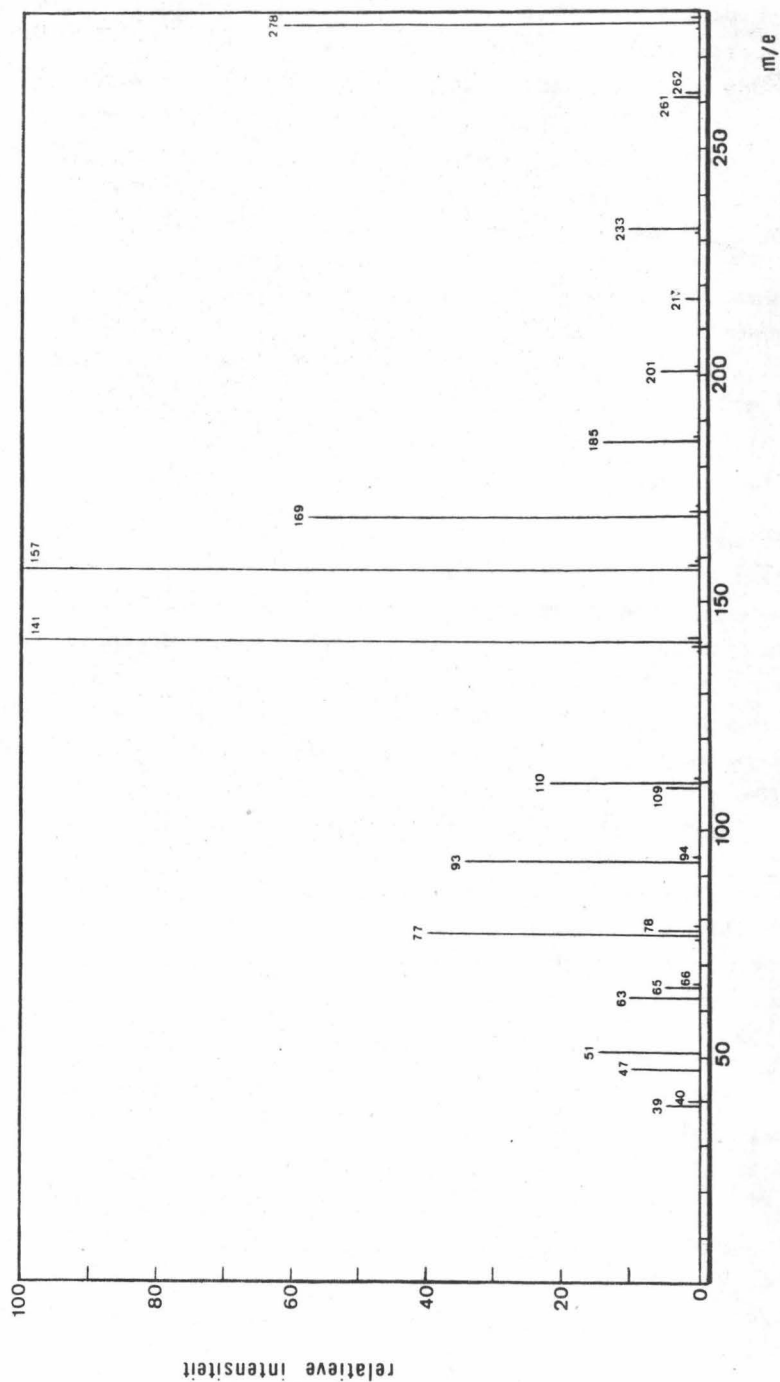
Het massaspektrum van 4a wordt gekarakteriseerd door een reeks fragmentionen waarvan de belangrijkste zijn : m/e 278 (61 %), 262 (2 %), 261 (4 %), 233 (11 %), 217 (2 %), 201 (6 %), 185 (14 %), 169 (58 %), 157 (100 %), 141 (100 %), 110 (22 %), 109 (5 %), 94 (1 %), 93 (36 %), 78 (6 %), 77 (40 %), 66 (1 %), 65 (5 %), 63 (11 %), 51 (15 %), 47 (10 %), 40 (2 %) en 39 (5 %).

Door beschieting met elektronen wordt in eerste instantie een elektron onttrokken aan het zwavel-atoom van het molekulaire ion waarna een α -splitsing aan de $>P=S^{+}$ van het zeer onstabiel radikaalion optreedt met vorming van het stabiel ion $>P\equiv S^{+}$ en een neutraal brokstuk (radikaal). Op deze wijze kunnen een drietal stabiele radicalen afgesplitst worden, nl. een benzeen-, een ethoxide- en een fenoxidegroep welke aanleiding geven tot de vorming van resp. ion I (m/e 201), ion II (m/e 233) en ion III (m/e 185) zoals geïllustreerd in tabel 7.

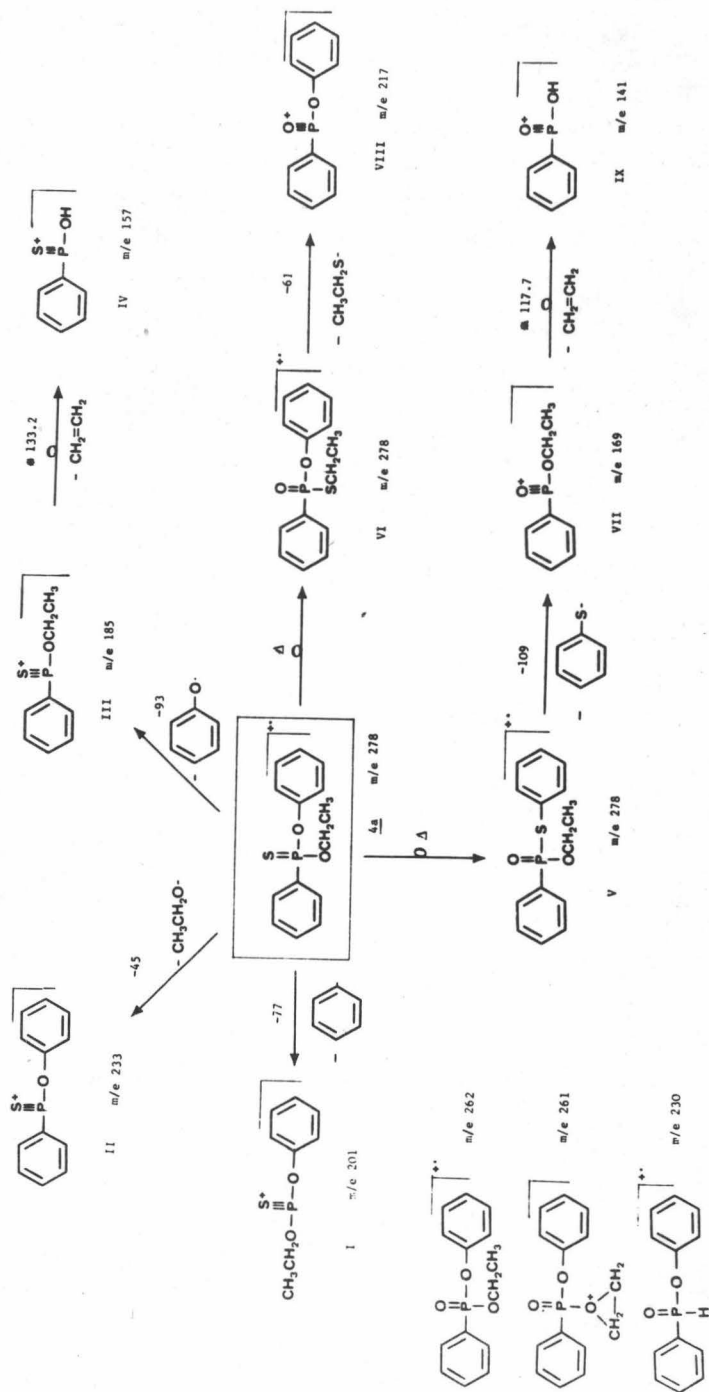
Ion III kan verder afbreken tot ion IV (m/e 157) door uitsluiting van een neutrale molekulen (ethyleen). Deze overgang gaat gepaard met de vorming van een metastabiel ion bij m/e 133,2.

Het is dus duidelijk dat met deze typische α -splitsing reeds veel pieken kunnen verklaard worden. Een tweede karakteristieke eigenschap van deze reeks verbindingen is de omlegging van $P(S)O^{-}$ tot $P(O)S^{-}$ onder invloed van warmte in de bron van de massaspektrometer. Deze intermediaire vorming van ionen V en VI wordt gepostuleerd om de ionen VII (m/e 169) en VIII (m/e 217) te verklaren. Deze ionen kunnen eveneens gevormd

Figuur 5 : Massa-spektrum van 4a.



TABEL 7 : Fragmentatiepatroon van 4a



worden door eenzelfde α -splitsing zoals bij het molekulair ion. Op een analoge wijze kan ook het ion IX (m/e 141) gevormd en aangetoond worden door het metastabiel ion bij m/e 117,7. Een identieke thermische isomerisatie werd reeds voorgesteld voor fosforothionaten (17).

De fragmentionen met lagere m/e -verhouding zijn als volgt te verklaren : m/e 110 en 109 zijn thiofenol en thiofenoxide, m/e 94 en 93 fenol en fenoxide, m/e 77 C_6H_5 , m/e 63 $P \equiv S^+$, m/e 47 $P \equiv O^+$ en m/e 66, 65, 40 en 39 zijn afbraakprodukten van thiofenol en fenol.

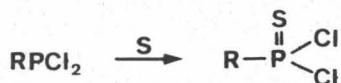
De ionen m/e 262 en 261, met weliswaar lage intensiteit, zijn alleen te verklaren door aan te nemen dat het monster een zeer kleine hoeveelheid $P=O$ derivaat bevat, dat vanwege de hoge gevoeligheid van de massaspektrometer nog gedetekteerd wordt.

HOOFDSTUK II : SCHEIKUNDIGE EIGENSCHAPPEN VAN O-ALKYL-O-ARYL
 =====
 FENYLFOFONOTHIOATEN
 =====

1. ELEKTRONISCHE STRUKTUUR VAN ORGANOFOSFORVERBINDINGEN

Fosfor in zijn elementaire toestand heeft een $3s^2 3p^3$ -configuratie, doch ook het 3d orbitaal kan deelnemen bij de vorming van fosforverbindingen. Deze overgang van $3s^2 3p^3$ naar $3s^2 3p^2 3d$ vergt echter een relatief hoge energie van ± 200 kcal/mol (~ 9 eV). De $3s^2 3p^3$ -configuratie geeft aanleiding tot fosforverbindingen van het type PX_3 met een coordinatiegetal 3.

Daar trivalente fosfor, coordinatief gezien, sterk onverzadigd is, bestaat de neiging een coordinatienummer 5 te vormen door sp^3 -hybridisatie; d.w.z. dat PX_3 verbindingen zeer reactieve nukleofielen zijn die dikwijls aangewend worden voor synthese van verbindingen met hoger coordinatienummer zoals in volgend voorbeeld :



De meeste fosforverbindingen zijn dan ook derivaten van covalente tetravalente fosfor overeenkomstig een $4sp^3$ -hybridisatie. Fosforverbindingen met coordinatiegetal 5 en 6 komen veel minder voor doch kunnen belangrijke intermediaire of transitietoestanden zijn bij nukleofiele reakties waar sp^3d -hybridisatie optreedt.

Om de valenties te eerbiedigen worden verbindingen van het type X_3PO voorgesteld door $P=O$ (dubbel binding) of door $P \rightarrow O$ (semipolaire binding). In feite is het zo dat de 4 elektronen van de sp^3 orbitalen gericht zijn naar het zuurstofatoom zodat met de 2p-orbitalen van de zuurstof vier σ -bindingen ontstaan. Een π -bindingssysteem overkoepelt dit σ -skelet wegens de vorming van een $d_{\pi}-p_{\pi}$ binding van een fosforelektron met zuurstof.

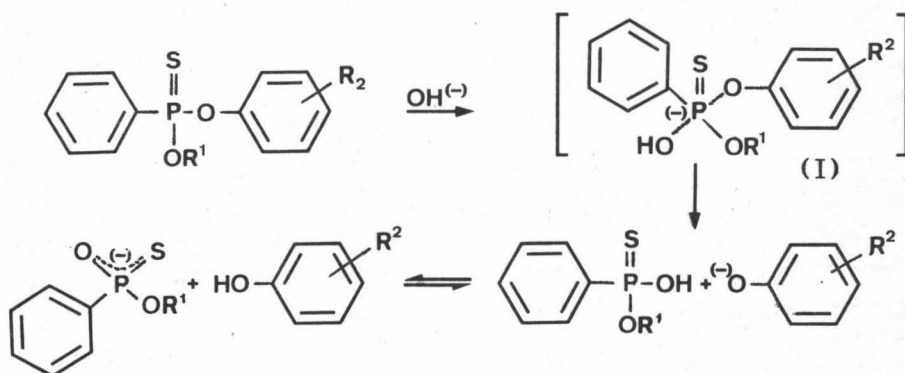
2. BELANGRIJKSTE CHEMISCHE REAKTIES

Fosfonaten ondergaan, zoals de meeste fosforzure esters, enkele typische reacties die belangrijk kunnen zijn met betrekking tot hun biologische activiteit omdat ze meestal invloed hebben op de activiteit zelf en op de afbraak.

a. Hydrolyse

De hydrolyse van fosforzure esters verloopt volgens verschillende reaktiemechanismen naargelang de zuurtegraad (18), wat van groot praktisch belang is.

De hydrolyse in alkalisch milieu is een reactie van eerste orde, zowel ten opzichte van het hydroxyl-ion als de ester-groep, waarbij de P-O binding verbroken wordt. Het reactieschema is voorgesteld als volgt :

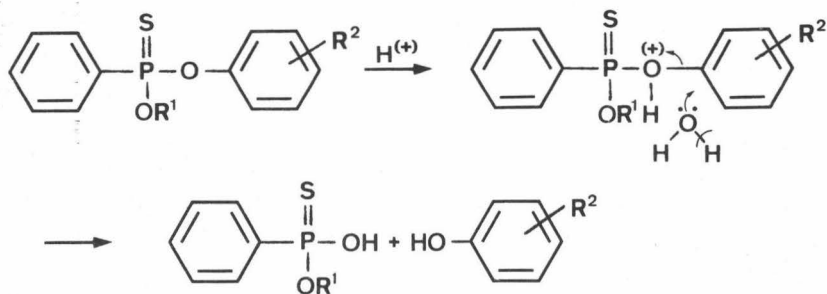


De reaktiesnelheid wordt bepaald in de eerste stap waar het OH^- -ion het fosforatoom aanvalt en een reactie van het type $\text{S}_\text{N}2$ veroorzaakt.

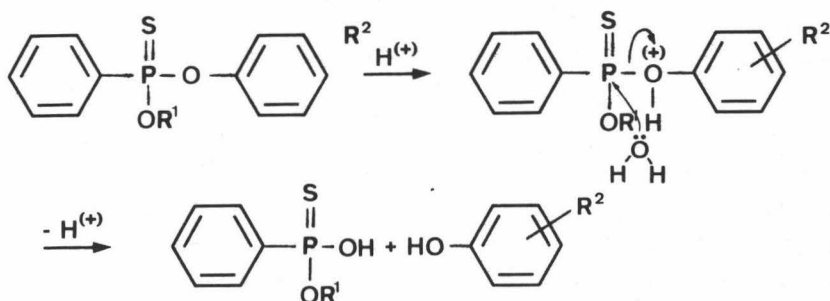
Transitietoestand (I) is energetisch voordelig omdat fosfor structuren kan vormen met coördinatiegetal 5 zodat een $3s^2 3p^3 3d^1$ configuratie optreedt in de vorm van een trigonale bipyramide. Dit patroon bevat dus niet-equivalente bindingen zodat met dezelfde bindingslengten de axiale bindingen sterker moeten zijn. Wegens de $sp^3 d$ hybridizatie hebben de bindingen eenzelfde energie zodat de axiale bindingsafstanden langer zijn

dan deze van de equatoriale bindingen. Dit betekent dat de SN_2 transitietoestand substitutie- en leavinggroepen bevoordeligt in de axiale positie. In deze omstandigheden treedt dan ook snel een Walden-inversie op bij de hydrolyse. Hoe intenser de positieve lading van het fosforatoom hoe groter de hydrolysesnelheid zal zijn. Deze positieve lading kan zowel inductief als sterisch beïnvloed worden door de omringende groepen. Zo is de alkalische hydrolyse van thiono-esters trager dan de oxon-derivaten ($P=O$) daar zwavel minder elektronegatief is zodat de effectieve lading op het fosforatoom kleiner is. Ook de lengte van de R^1 -groep speelt een rol : hoe langer de keten, hoe kleiner de positieve lading op het fosforatoom en des te groter de stabiliteit van de molekule. De substituent R^2 speelt eveneens een inductieve rol. Elektronenzuigende substituenten zoals $-NO_2$, $-CN$ en halogenen vergroten de positieve lading van het fosforatoom terwijl elektronenafstotende substituenten zoals alkylgroepen het positief karakter van P verzwakken.

Bij hydrolyse in neutraal en zuur milieu neemt eerst een protonatie plaats aan het esterzuurstofatoom. Het hydroxylion reageert dan met het koolstofatoom door een SN_2 reactie:



In sterk zuur milieu gebeurt een direkte aanval van het hydroxylion op het fosforatoom :



Bij vergelijking van de hydrolyse van fosfaten, fosfonaten en fosfinaten (met resp. 0,1 en 2 P-C bindingen) blijkt dat de π -binding van de resterende P-O-R groepen sterker wordt met stijgend aantal P-C bindingen daar deze bindingen praktisch niet-polair en hydrolytisch inert zijn, een grotere positieve lading op het fosforatoom komt en de alkalische hydrolyse bevordert wordt door de P-C bindingen; dit in tegenstelling met de zure hydrolyse die negatief beïnvloed wordt.

b. Thiono- thiolo isomerisatie

Een veel voorkomende reactie is de isomerisatie van thiono- en thioloderivaten :



Deze isomerisatie verloopt traag bij kamertemperatuur doch is vrij belangrijk bij hogere temperaturen zodat bij de synthese van P=S verbindingen dikwijls isomeren voorkomen die zeer storend kunnen zijn : ze hydrolyseren sneller en hun in vitro biologische activiteit is groter (P=O).

c. Oxydatie

De P=S binding kan gemakkelijk geoxydeerd worden tot het analoge oxon met behulp van verscheidene oxydantia. Deze reactie is van groot belang daar ze de biologische aktiveringsreactie

is van thiofosforverbindingen. Verschillende methoden zijn beschreven; ze worden samengebracht in volgend overzicht :

Oxydans	Referenties
Koud rokend salpeterzuur	Giang en Hall (19)
Verdund broomwater	Archer (20)
N-Broomsuccinamide	Schultzmman en Barthel (21)
UV-licht	Ackermann (22)
H ₂ O ₂ -azijnzuur	Beam en Hankinson (23)
Broomdampen	Villeneuve et al. (24)
m-chloropenbenzoëzuur } Perazijnzuur } H ₂ O ₂	Dixon et al. (25)

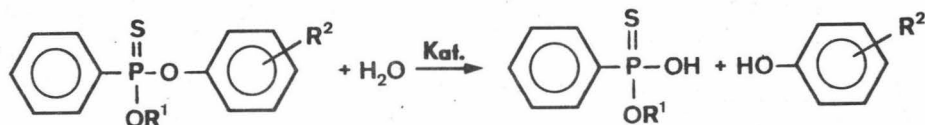
De keuze van het reagens is wel afhankelijk van de organofosforverbinding en van het proefopzet. Sommige reagentia geven nevenreacties en andere geven geen volledige omzetting.

3. DE HYDROLYSE VAN O-ALKYL-O-ARYL FENYLFOSFONOTHIOATEN

De afbraak van pesticiden is een belangrijk aspekt van de problematiek van de pollutie door deze verbindingen. Een der belangrijkste afbraakmechanismen bij organische fosforpesticiden is de hydrolyse, waardoor de actieve molekule afbreekt tot twee meestal niet-actieve produkten. Een preciese kennis van hydrolysesnelheden en de kinetiek ervan is dus van groot belang zowel voor de bepaling van de aktiviteit als voor de kennis van de persistentie van deze verbindingen in het milieu.

a. Kinetiek van de hydrolyserieaktie

De alkalische hydrolyserieaktie van fosfonaten kan weergegeven worden door volgende vergelijking :



Overeenkomstig de wet der massawerking is de reaktiesnelheid afhankelijk van de concentratie der beide reagentia:

$$-\frac{dC_{OP}}{dt} = k \cdot C_{OP} \cdot C_{OH^-} \quad (\text{vgl. 1})$$

met C_{OP} = residuele concentratie (mol/l) van het fosfonaat op tijd t

C_{OH^-} = concentratie van de hydroxylionen

Daar de hoeveelheid hydroxylionen gedurende de reactie als konstant mag beschouwd worden (grote overmaat) kan vgl. (1) herleid worden tot :

$$-\frac{dC_{OP}}{dt} = K \cdot C_{OP} \quad (\text{vgl. 2})$$

zodat de reaktiesnelheid rechtstreeks afhankelijk is van de concentratie. De reactie is dus van pseudo- eerste orde. Na integratie bekomt men :

$$Kt = 2,3 \log \frac{C_{OP}^0}{C_{OP}} \quad \text{of} \quad \log C_{OP} = \log C_{OP}^0 - \frac{Kt}{2,3} \quad (\text{vgl. 3})$$

met C_{OP}^0 = de oorspronkelijke concentratie (mol/l) op $t = 0$
 K = de waargenomen snelheidskonstante (t^{-1}).

$K/2,3$ is dus de richtingscoëfficiënt van de rechte bekomen door de gemeten concentratie (ordinaat) uit te zetten in functie van de tijd (in abscis).

Bij reacties van eerste orde kan men eveneens gebruik maken van een meer aansprekende voorstelling van de hydrolysesnelheid, nl. $t_{1/2}$ (min), de halfwaarde-tijd; d.i. de tijd nodig om de helft van een bepaalde hoeveelheid ester te hydrolyseren :

$$t_{1/2} = \frac{2,3 \log 2}{K} = \frac{0,69}{K} \quad (\text{vgl. 4})$$

b. Bepaling van de hydrolysesnelheid

Verschillende methodes ter bepaling van de hydrolyse van organofosforverbindingen zijn beschreven in de literatuur. Naargelang

de aangewende analytische instrumentele techniek kunnen ze onderverdeeld worden in vier groepen:

1. Chromatografische bepaling van het resterend organofosfaat (vooral gaschromatografie) (26)
2. Spektrofotometrische of kolorimetrische bepaling van een afbraakprodukt (27)
3. Enzymatische bepaling van de resterende cholinesterase-inhibitor (28)
4. Bepaling van radioactief gemerkte afbraakprodukten (29).

- Gaschromatografisch

Gaschromatografie is de belangrijkste instrumentele techniek geworden bij de bepaling van organofosforpesticiden, dit vooral door het aanwenden van zeer gevoelige en specifieke fosfordetektors zoals de alkali flame ionization detector (A.F.I.D.) en de vlam-fotometer detector (F.P.D.), die toelaten hoeveelheden van de orde van één nanogram te bepalen. De methode voor de bepaling van de hydrolysesnelheid is tamelijk eenvoudig. Bepaalde hoeveelheden van stockoplossingen van de fosfonaten (in aceton) worden opgelost in buffers van een welbepaalde zuurtegraad bij een konstante temperatuur. Na verschillende tijden wordt een aliquot genomen en geëxtraheerd met n-hexaan. Dit extrakt wordt na drogen over watervrij natriumsulfaat, geïnjecteerd in de gaschromatograaf en de concentratie van het resterend uitgangsprodukt bepaald t.o.v. een standaardreeks. De hydrolysekonstante wordt berekend met vgl. 3 door de methode der kleinste kwadraten.

- Spektrofotometrisch

De hydrolyse van fosfonaten resulteert in een fosforzure groep en een fenol. Deze fenolen vertonen een intense absorptiepiek in het U.V.-zichtbaar gebied zodat de absorptie bij deze golflengte een maat is voor de concentratie. Van een stockoplossing in aceton wordt een bepaalde hoeveelheid in een bufferoplossing gebracht. Na regelmatige tijdsintervallen wordt een aliquot overgebracht in een spektrofotometercel en de extinctie van het ontstane fenoxide-ion gemeten bij de vooraf bepaalde golflengte van maximale absorptie. De hydrolysekonstante wordt berekend door de methode van de kleinste kwadraten volgens de vergelij-

king :

$$\log (D_{\infty} - D_t) = \log (D_{\infty} - D_0) + Kt/2,3 \quad (\text{vgl. 5})$$

D_{∞} , D_0 en D_t zijn resp. de extincties van het gevormde fenoxide-ion bij resp. $t = \infty$, 0 en t . t_{∞} wordt bereikt als de absorptie onveranderd blijft.

Daar $(D_{\infty} - D_t)$ en $(D_{\infty} - D_0)$ evenredig zijn met resp. C_{OP} en C_{OP}^0 is deze vergelijking analoog met vgl.3 doch met een tegenovergesteld teken voor de K -term omdat hier de vorming van een afbraakprodukt gemeten wordt. Uitzetten van $\log (D_{\infty} - D_t)$ tegenover de tijd geeft dus een rechte met $-K/2,3$ als richtingscoëfficiënt en $\log (D_{\infty} - D_0)$ als intercept op de y -as.

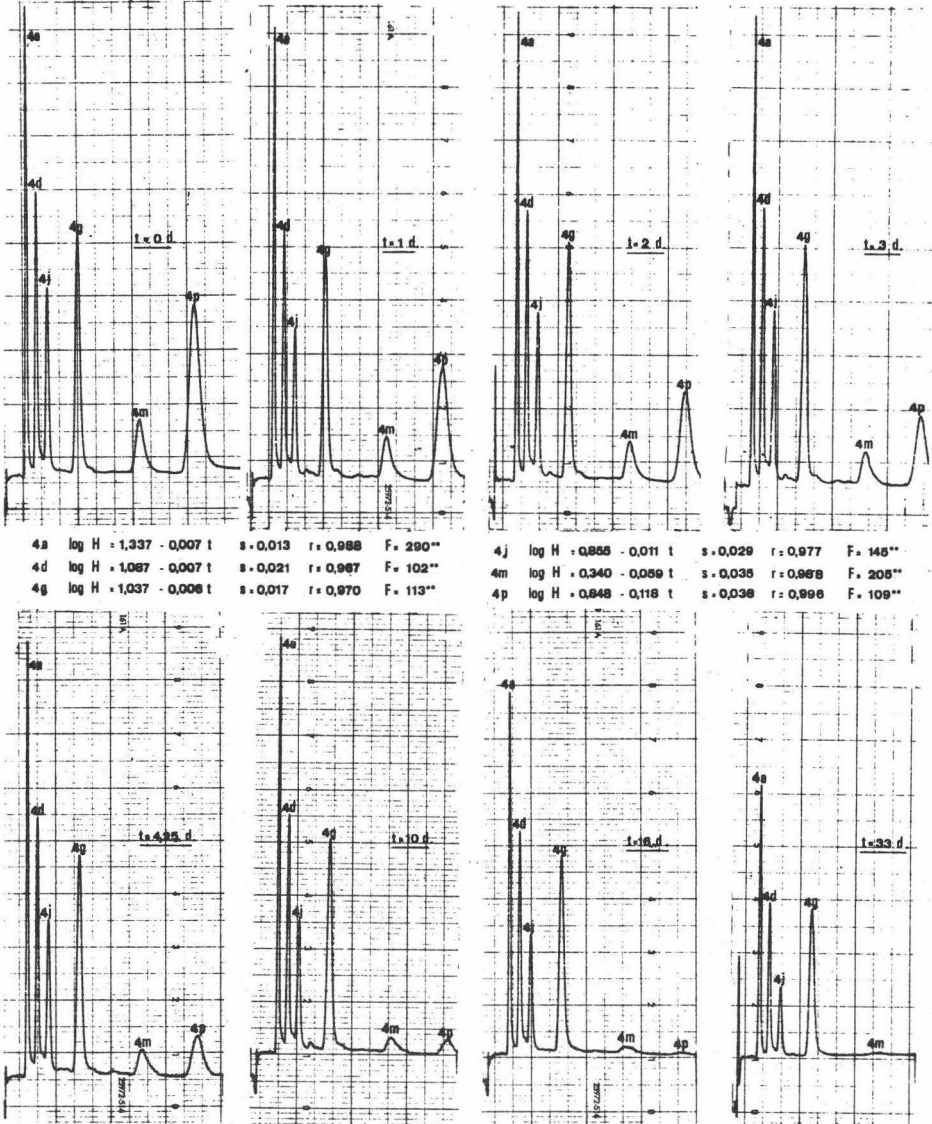
- Enzymatisch

Het resterend actief pesticide kan ook enzymatisch bepaald worden. Bij regelmatige tijdsintervallen wordt eveneens een aliquot genomen uit de bufferoplossing van de inhibitor en de biologische aktiviteit in vitro wordt bepaald volgens de methode beschreven in hoofdstuk IV. De aldus gemeten restaktiviteit (% van de oorspronkelijke aktiviteit) staat rechtstreeks in verhouding met de concentratie van het fosfonaat zodat de berekening van de hydrolysesnelheid analoog is als bij de gaschromatografische bepaling.

c. Resultaten en bespreking

De hydrolyse van de thiofosfonaten verloopt onder de vermelde proefomstandigheden volgens een pseudo-eerste orde reactie. De eerste orde hydrolysekonstante werd vooral bepaald volgens de gaschromatografische methode bij 60°C en verschillende zuurtegraden. De zuurtegraden en de ionensterkte (0.02 M) van het reaktiemengsel werden konstant gehouden door bufferoplossingen. Orthofosfaatbuffers werden gebruikt om een pH-bereik van 4 tot 11 te omvatten. Ter illustratie wordt in fig. 6 de opeenvolgende chromatogrammen afgebeeld van enkele para-gesubstitueerde molekulen bij pH 7. Men ziet duidelijk dat de afbraaksnelheid niet gelijkmatig verloopt voor de verschillende bindingen onderling. In fig. 7 tot en met 9 wordt de hydro-

Figuur 6 : Hydrolyse van 4a, 4d, 4g, 4j, 4m en 4p (bij pH 7 en 60°C) bepaald volgens de gaschromatografische methode.



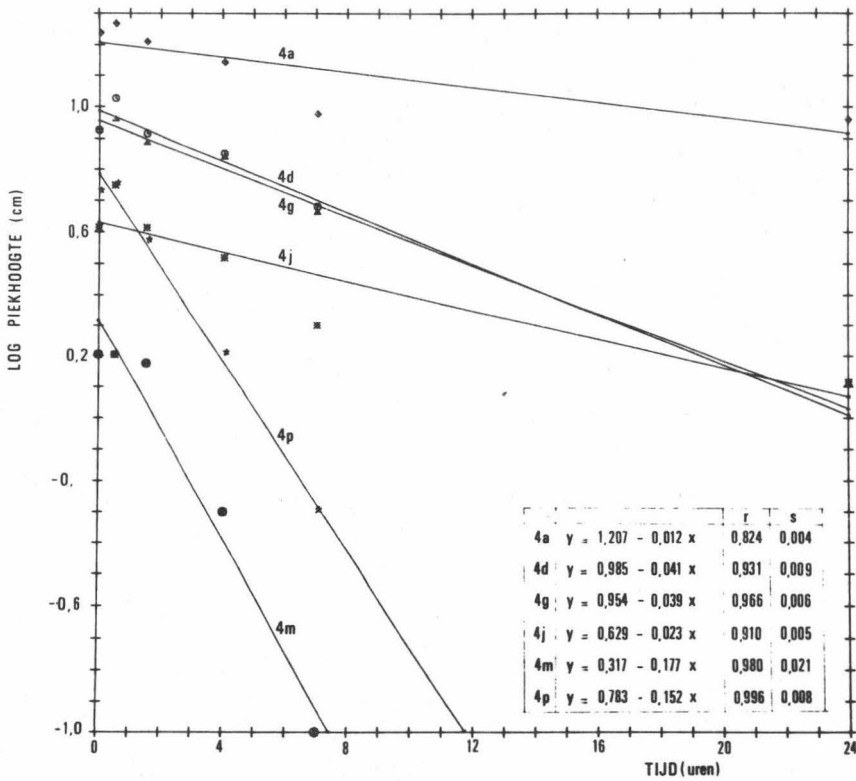
lysesnelheid afgebeeld in grafieken van log piekhoogte ten opzichte van de tijd voor resp. para, meta en ortho derivaten bij pH 9. De hydrolysekonstanten werden berekend door de methode der kleinste kwadraten aan de hand van een computerprogramma. Deze k_{hyd} -waarden zijn samengebracht in tabel 8. Aangezien de reactie van 1° orde is kunnen eveneens halfwaardetijden ($t_{1/2}$) berekend worden, die een meer aanschouwelijk beeld geven van de afbraaksnelheid. $t_{1/2}$ -waarden zijn samengebracht in tabel 9. Uitzetten van deze hydrolyse-konstanten tegenover de zuurtegraad in dubbel logaritmische schaal geeft een typisch verloop zoals afgebeeld in de figuren 10, 11 en 12 voor resp. para, meta-en ortho-derivaten. De grote invloed van de zuurtegraad op de hydrolysesnelheid blijkt eveneens uit fig. 13 waar de afbraak van 4h afgebeeld is bij verschillende pH.

Ter confirmatie werden ook voor sommige molekulen de hydrolysekonstanten bepaald met de spectrofotometrische en de enzymatische methode. De bekomen hydrolysekonstanten waren analoog zoals blijkt uit tabel 10. Daar de GLC-methode eenvoudig, snel en goed reproduceerbaar is werd aan deze techniek de voorkeur gegeven. Daarenboven kunnen een vijftal verbindingen tegelijkertijd bepaald worden, zoals afgebeeld in fig. 6, op voorwaarde dat de retentietijd verschillend is. Ook qua zuiverheid van de te onderzoeken verbindingen moeten de eisen niet zo hoog zijn als bijv. bij de spectrofotometrische methode, waar fenolen die nog aanwezig kunnen zijn als reaktiemiddel, de meting storen. De enzymatische methode heeft het nadeel dat het thiofosfonaat eerst moet omgezet worden tot fosfonaat zodat deze techniek nog omslachtig en langdradig uitvalt voor de bepaling van hydrolysesnelheden.

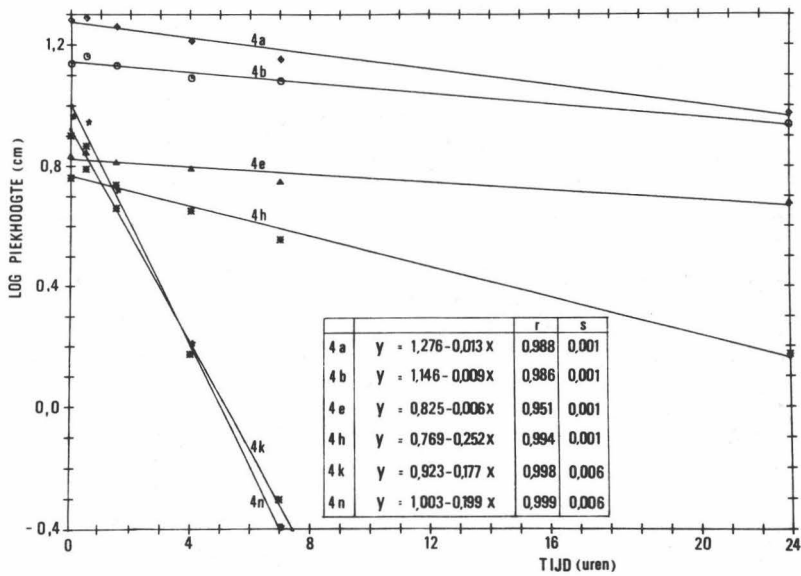
Uit de tabellen blijkt dat de hydrolysesnelheid sterk afhankelijk is van déze substituenten welke de lading op het fosforatoom beïnvloeden. Elektronenaantrekkende substituenten die het fosforatoom elektropositief maken versnellen de hydrolyse. Per substitutieplaats is de sekwentie in dalende hydrolysesnelheid als volgt :

voor para	$\text{NO}_2 > \text{CN} > \text{Cl} > \text{H} > \text{CH}_3 > \text{OCH}_3$
voor meta	$\text{NO}_2 > \text{CN} > \text{Cl} > \text{OCH}_3 > \text{H} > \text{CH}_3$
voor ortho	$\text{NO}_2 > \text{CN} > \text{Cl} > \text{H} > \text{CH}_3 > \text{OCH}_3$

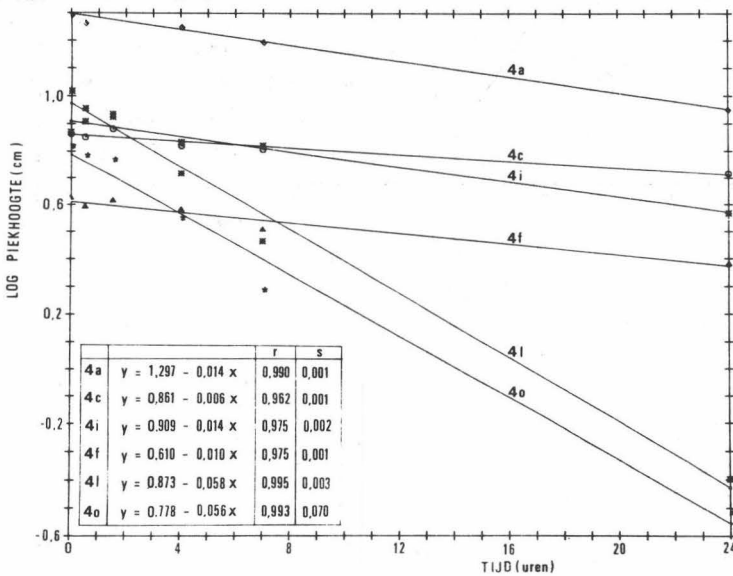
Figuur 7 : Hydrolyse van para-gesubstitueerde R²-derivaten
(bij pH 9, 60°C).



Figuur 8 : Hydrolyse van meta-gesubstitueerde R^2 -derivaten
(bij pH 9, 60°C).



Figuur 9 : Hydrolyse van ortho-gesubstitueerde R^2 -derivaten
(bij pH 9, 60°C).



TABEL 8 : Hydrolysekonstanten (min.^{-1})

4	Substituent	pH 11 $\times 10^{-3}$	pH 9 $\times 10^{-4}$	pH 7 $\times 10^{-5}$	pH 5 $\times 10^{-6}$	pH 3 $\times 10^{-7}$	log $1/K_{\text{hydr.}}$ pH 9
a	H	6,59	4,98	1,28	4,79	31,94	3,303
b	2 - Me	3,30	3,07	0,48	3,19	31,94	3,513
c	3 - Me	4,25	2,30	0,64	4,79	63,89	3,638
d	4 - Me	4,29	3,72	1,12	3,16	7,99	3,429
e	2 - OMe	4,22	2,30	0,48	3,19	31,94	3,638
f	3 - OMe	11,15	3,83	0,80	6,40	47,92	3,417
g	4 - OMe	5,71	1,50	0,96	4,79	15,97	3,824
h	2 - Cl	15,41	9,58	2,24	4,79	95,83	3,019
i	3 - Cl	14,91	5,37	1,60	6,40	95,83	3,270
j	4 - Cl	11,54	8,82	1,76	7,99	47,92	3,055
k	2 - CN	- x	44,85	22,84	22,36	335,42	2,348
l	3 - CN	- x	22,23	4,95	11,18	63,89	2,653
m	4 - CN	- x	44,85	9,42	14,37	79,86	2,348
n	2 - NO ₂	- x	76,28	29,87	31,94	271,53	2,118
o	3 - NO ₂	- x	21,47	6,87	12,78	95,83	2,668
p	4 - NO ₂	- x	58,27	18,85	30,35	175,69	2,235
q	4 - F		3,86				3,413
r	4 - Br		8,89				3,051
s	4 - I		8,96				3,048
t	4 - Et		2,62				3,582
u	4 - n-prop		2,86				3,544
v	2,4-di Cl		17,62				2,734
w	2,3,4,5,6-penta Cl	-					-
x	2,5 di Cl -4-Br		16,82				2,774
y	4 - CN MeO		20,68				2,684
z	4-CN(n-prop O)		39,65				2,402
4'	x oxon		30,56				2,515

x De hydrolyse verliep zeer snel (binnen de 5 min) zodat nauwkeurige metingen zeer moeilijk waren met de aangewende methode.

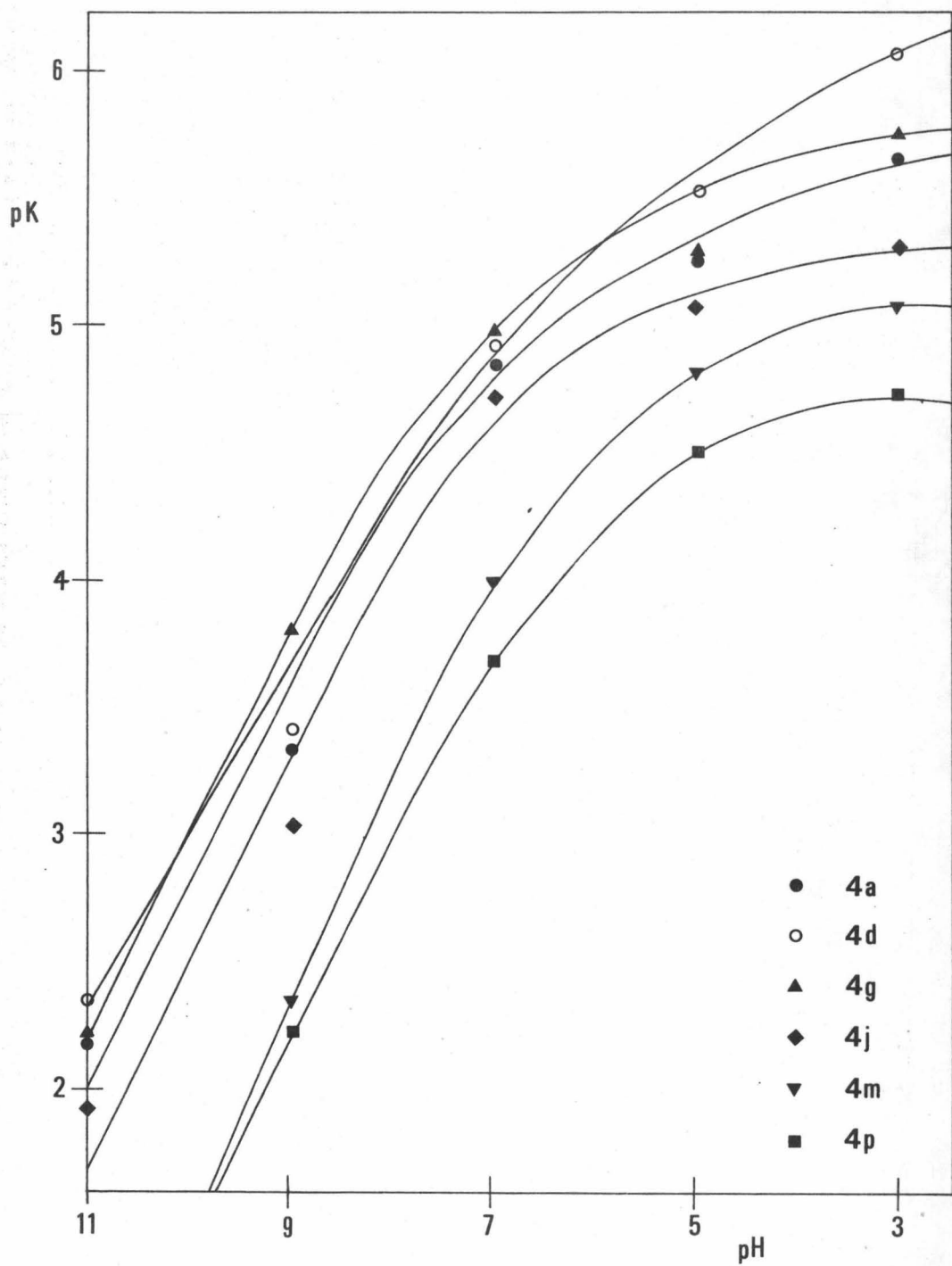
TABEL 10 : Vergelijking tussen de GLC-, de spektrofotometrische en de enzymatische methode voor de bepaling van de hydrolysekonstanten (min.^{-1}) bij pH 9 en 60°C.

R_1	R_2	Nr	GLC-methode k_{hyd}	U.V.-methode k_{hyd}	enzyme methode k_{hyd}
Me	4-CN	4x	$2,07 \cdot 10^{-3}$	$2,12 \cdot 10^{-3}$	$2,2 \cdot 10^{-3}$
Et	4-CN	4m	$4,49 \cdot 10^{-3}$	$4,38 \cdot 10^{-3}$	$4,5 \cdot 10^{-3}$
n-Prop	4-CN	4z	$3,97 \cdot 10^{-3}$	$4,05 \cdot 10^{-3}$	$4,0 \cdot 10^{-3}$
Et	2-NO ₂	4n	$7,63 \cdot 10^{-3}$	$7,38 \cdot 10^{-3}$	$7,4 \cdot 10^{-3}$
Et	3-NO ₂	4o	$2,15 \cdot 10^{-3}$	$2,00 \cdot 10^{-3}$	$2,1 \cdot 10^{-3}$
Et	4-NO ₂	4p	$5,83 \cdot 10^{-3}$	$6,02 \cdot 10^{-3}$	$6,0 \cdot 10^{-3}$

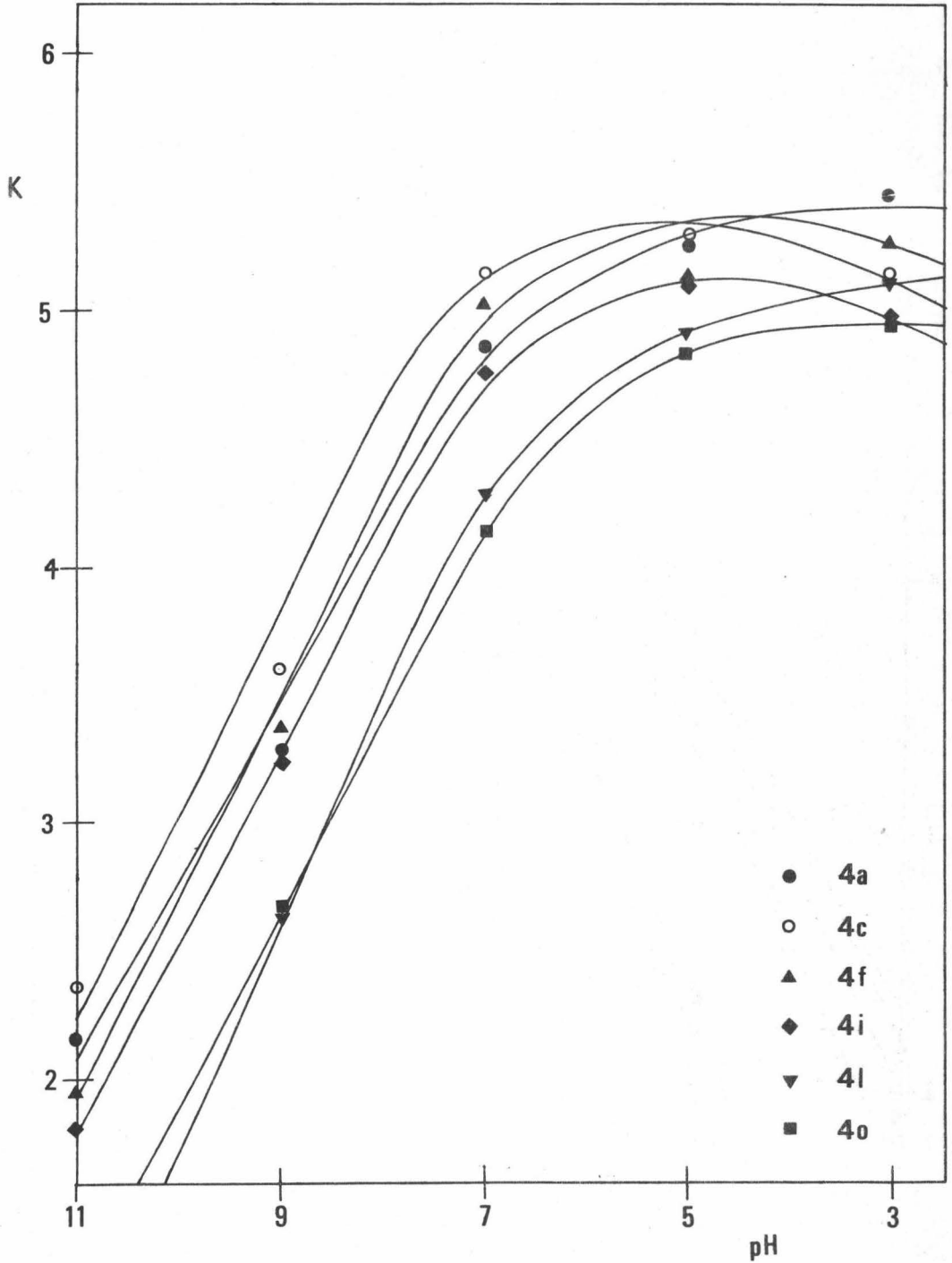
TABEL 9 : Halfwaardetijden

Nr	Substituent	pH 11 min	pH 9 uur	pH 7 dag	pH 5 dag	pH 3 dag
a	H	104,70	23,03	34,43	100,03	150,02
b	2 - CH ₃	209,09	37,46	99,83	150,21	150,02
c	3 - CH ₃	162,35	50,00	74,87	100,03	75,00
d	4 - CH ₃	160,84	30,91	42,78	151,64	599,71
e	2 - OCH ₃	163,51	50,00	99,83	150,21	150,02
f	3 - OCH ₃	61,88	30,83	59,90	74,87	99,99
g	4 - OCH ₃	133,46	76,67	49,91	100,03	300,04
h	2 - Cl	44,78	12,00	21,39	100,03	50,00
i	3 - Cl	46,28	21,42	29,95	74,87	50,00
j	4 - Cl	59,79	13,04	27,23	59,97	99,99
k	2 - CN		2,56	2,10	21,43	14,29
l	3 - CN		5,17	9,68	42,86	74,89
m	4 - CN		2,56	5,09	33,34	60,00
n	2 - NO ₂		1,51	1,60	15,00	17,65
o	3 - NO ₂		5,36	6,97	37,49	50,00
p	4 - NO ₂		1,94	2,54	15,79	27,27
q			29,79			
r			12,94			
s			12,83			
t			43,89			
u			40,21			
v			6,53			
w			-			
x			6,84			
y			5,56			
z			2,56			
4'			3,76			

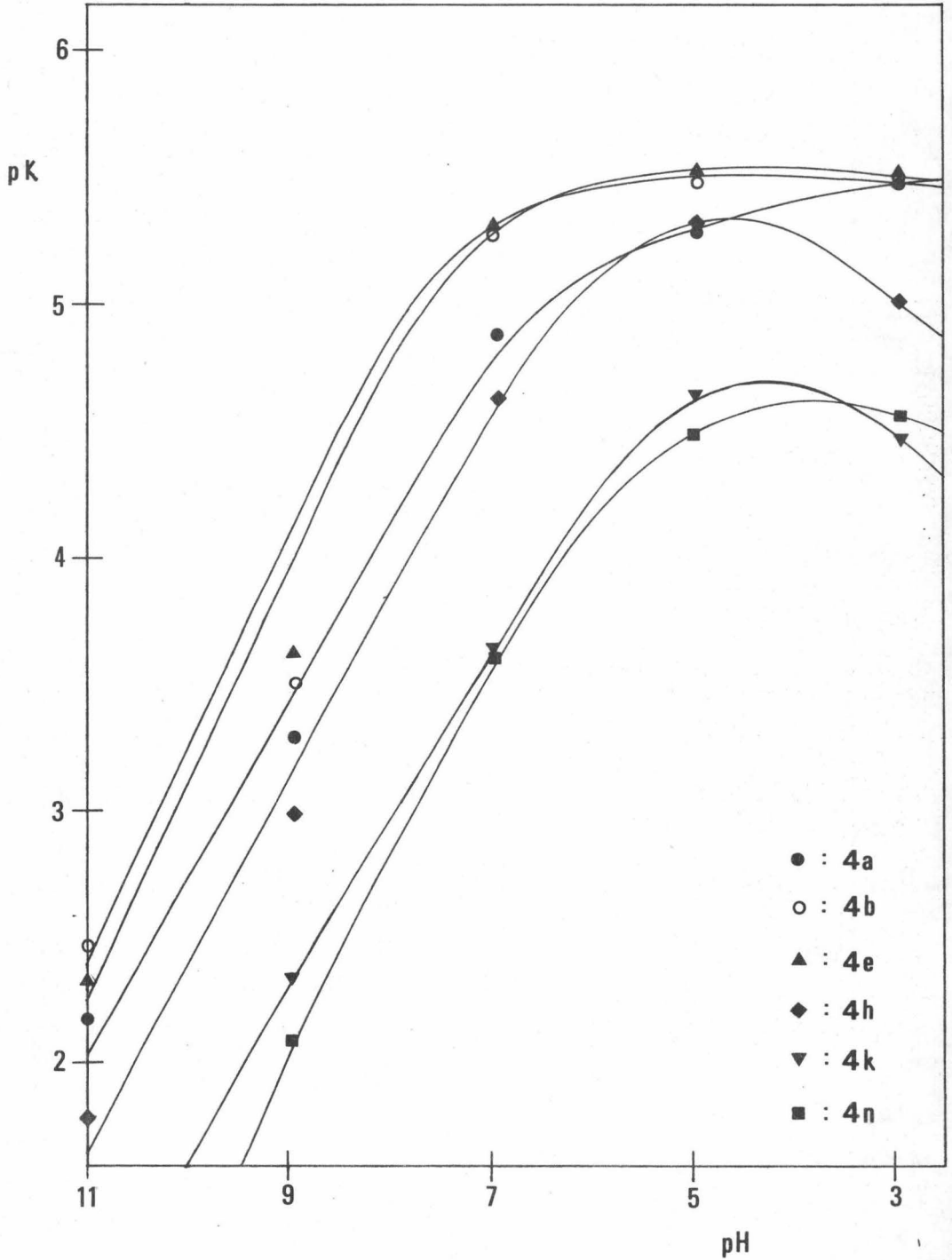
Figuur 10 : Invloed van de zuurtegraad op de hydrolyse-konstante van para-gesubstitueerde R^2 -derivaten.



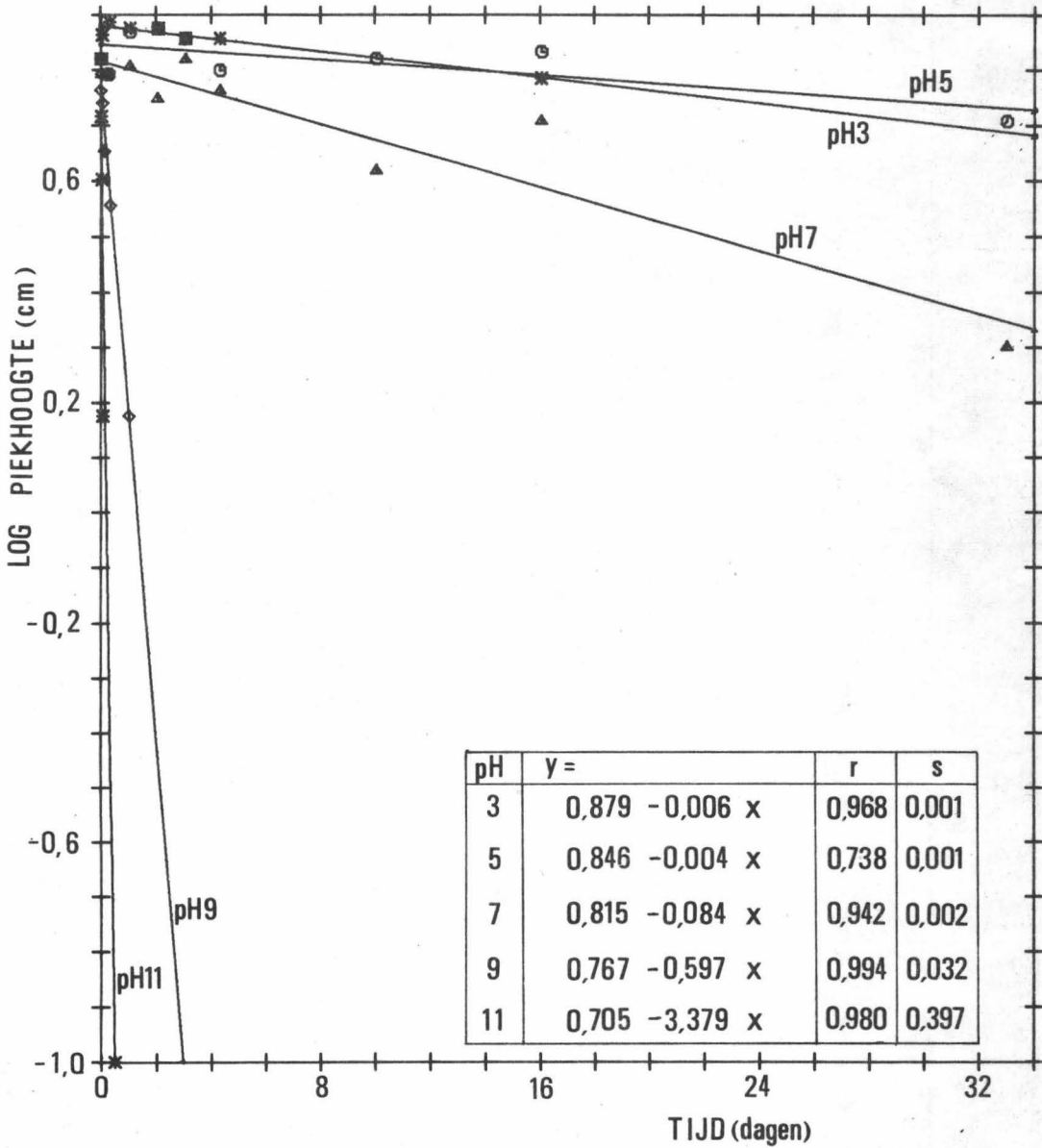
Figuur 11 : Invloed van de zuurtegraad op de hydrolyse-konstante van meta-gesubstitueerde R^2 -derivaten.



Figuur 12 : Invloed van de zuurtegraad op de hydrolyse-konstante van ortho-gesubstitueerde R^2 -derivaten.



Figuur 13 : Hydrolyse van 4h bij verschillende zuurtegraden.



Men kan duidelijk een verband bemerken tussen hydrolysesnelheid en de $P-O-C_{\text{arom}}$ stretching-vibraties. Het is inderdaad zo dat de sterkte van deze $P-O-C$ binding een rol speelt in beide gevallen. Per substituent beschouwd is de hydrolysesnelheid het grootst bij orthosubstitutie voor nitro-, cyano- en chloorverbindingen, dit in tegenstelling met methyl- en methoxy-substitutie. Substitutie van de $P-O$ -alkyl keten geeft



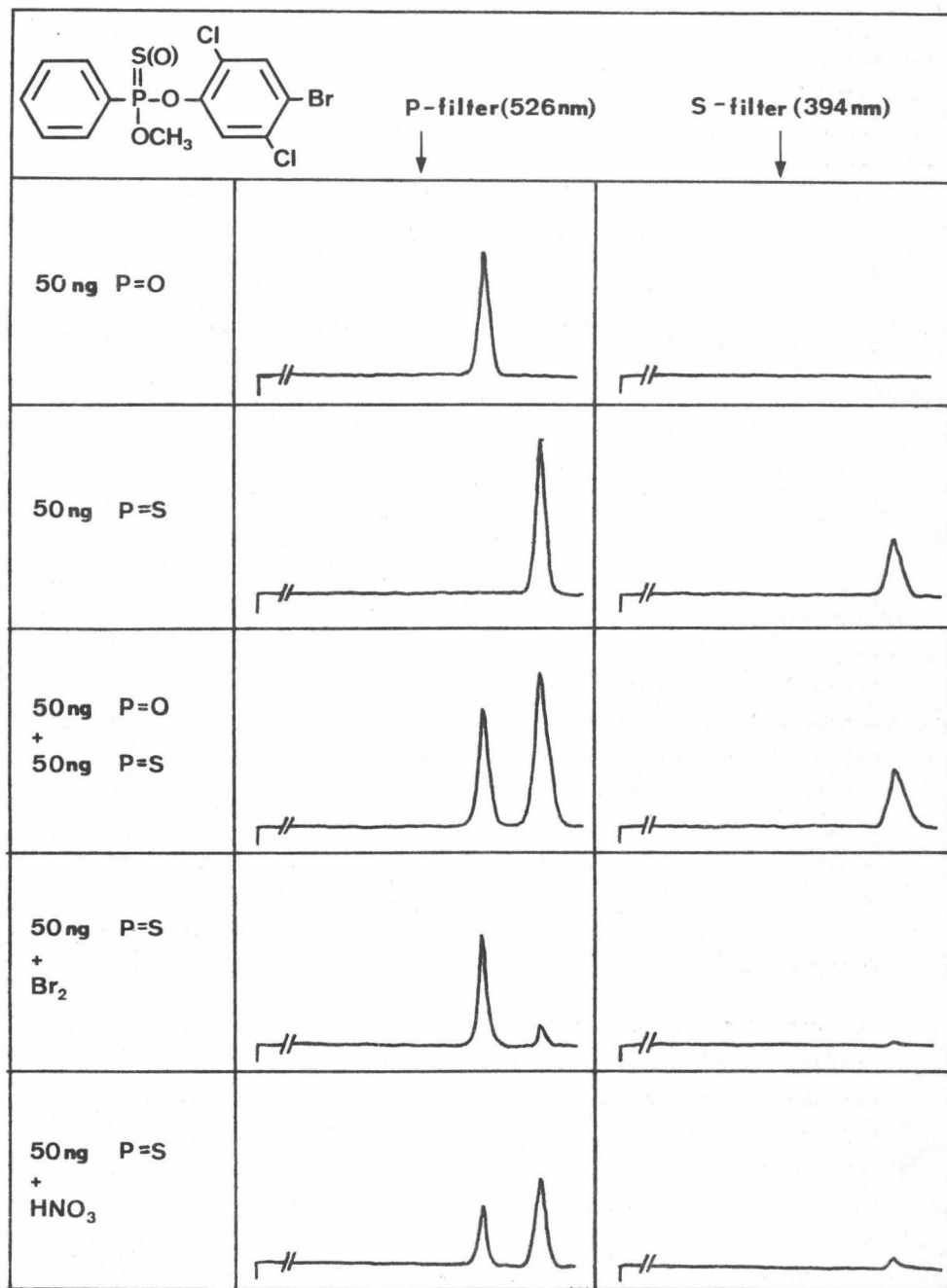
wat in overeenstemming is met een studie van Ginjaar (27) op dialkyl-p-nitrofenylfosfaten waar eveneens een dergelijk verloop kon aangetoond worden. Ook de $P=S$ of $P=O$ binding speelt een belangrijke rol aangezien de hydrolysesnelheid van het $P=O$ derivaat (4') dubbel zo groot is als het overeenkomstig $P=S$ derivaat (4w).

4. DE OXYDATIE VAN O-ALKYL-O-ARYL FENYLFOSFONOTHIOATEN

Diggle en Gage (30) toonden aan dat thiono- en dithiofosfaten (verbindingen met een $P=S$ binding) zeer slechte in vitro cholinesterase-inhibitoren zijn, dit in tegenstelling met fosfaten die zeer sterke in vitro werking vertonen. Het blijkt echter dat de $P=S$ verbindingen in het organisme (snel) omgezet worden tot de korresponderende fosfaten. Deze biologische aktivatie moet dus geïmiteerd worden alvorens de in vitro-aktiviteit bepaald wordt. Een ganse reeks oxydantia zijn beschreven in de literatuur (zie Hoofdstuk II.2.c.), doch de twee meestgebruikte zijn broom en salpeterzuur, zodat ze aangewend werden voor de oxydatie van de O-alkyl-O-aryl fenylfosfonothioaten.

De kwantitatieve omzetting van $P=S$ naar $P=O$ kan gaschromatografisch goed gekontroleerd worden met een vlamfotometerdetektor (FPD) met een specifieke fosfor-(526 nm) en zwavel -(394 nm) filter. Dit wordt geïllustreerd in fig. 14 voor 4x en het analoog oxon 4'. Hieruit blijkt dat de oxydatie met broomwater voor meer dan 95 % doorgaat terwijl met salpeterzuur slechts 50 à 60 % omgezet wordt. Bij de bepaling van de in vitro werking werden voorafgaandelijk alle thiofosfonaten geoxydeerd met broomwater.

Figuur 14 : Oxydatie van **4x**, zoals gecontroleerd door een FPD-GLC-detektor.



HOOFDSTUK III : FYSICOCHEMISCHE EIGENSCHAPPEN VAN O-ALKYL-O- =====

ARYL FENYLFOSFONOTHIOATEN =====

De behandeling van de fysicochemische eigenschappen van de O-alkyl-O-aryl fenylfosfonothioaten moet gezien worden in het kader van deze studie. Vooral déze eigenschappen die van belang zijn voor de biologische aktiviteit van deze verbindingen, d.w.z. deze die verband hebben met membraanpenetratie, hydrofiele en lipofiele eigenschappen en mobiliteit, worden onderzocht.

1. DE VERDELINGSCOEFFICIENT

a. Definitie

De verdelingscoëfficiënt wordt gedefinieerd als de fractie van een opgeloste stof die zich verdeeld heeft in de niet-polaire fase van een stelsel van gelijke volumes onmengbare oplosmiddelen. De verdelingscoëfficiënt kan dus uitgedrukt worden als k/l waarbij k de fractie is in de niet-polaire fase en l de fractie in de polaire fase. Daar $k + l = 1$ kan de verdelingscoëfficiënt ook omschreven worden als $k/1-k$. In de literatuur wordt de verdelingscoëfficiënt ook nog voorgesteld door p , doch daar dit in het verder verloop aanleiding kan geven tot verwarring met probaliteitstermen wordt dit symbool niet aangewend.

Fujita (31) voerde een substituentkonstante in, afgeleid van de verdelingscoëfficiënten, nl. :

$$\pi = \log \frac{(k/l)_X}{(k/l)_H} \quad (\text{vgl. 6}) \text{ waar } X \text{ en } H \text{ duiden op de verdelingscoëfficiënt van respectievelijk}$$

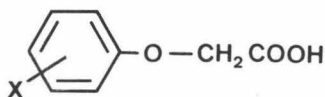
een gesubstitueerde en de ongesubstitueerde molekule met analoge structuur.

Verdelingscoëfficiënten zijn ook belangrijk in extraktieprocedures van verbindingen uit allerlei substraten (32). Een pesticide wordt bij de residubepaling meestal, na homogenisatie

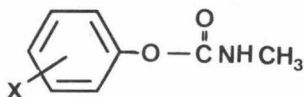
van het te onderzoeken monster, met een goed oplosmiddel verdeeld tussen twee niet mengbare solventen teneinde een scheiding te bekomen van het pesticide en een groot gedeelte van mogelijks interfererende bestanddelen. Dergelijke werkwijze kan gemakkelijk uitgevoerd worden omdat men beschikt over een grote reeks passende oplosmiddelen zodat de kans klein is om geen efficiënt solventenpaar te vinden voor elke groep pesticiden. De verdelingscoëfficiënt speelt hier uiteraard een belangrijke rol.

Ganse reeksen experimentele verdelingscoëfficiënten werden bepaald door Fujita (31) voor o.a. gesubstitueerde benzeenderivaten, fenoxiazijnzuurderivaten, benzoëzuurderivaten en fenolen. De π -waarden, berekend voor de individuele substituenten, van deze "standaard"-reeksen zijn sindsdien veelvuldig aangewend als benaderende π -waarden voor dezelfde substituenten in andere reeksen verbindingen. Zo hebben Hansch & Deutsch (33) in correlaties van een reeks methylcarbamaaten met een ringsubstituent X de π -waarden van de fenoxiazijnzuur-reeks genomen, wegens de analogie in moleculaire structuur :

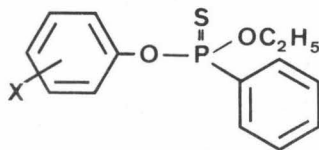
fenoxiazijnzuur



methylcarbamaat



fosfonothioaat



Om dezelfde reden is het dus mogelijk deze π -waarden over te nemen om correlaties uit te voeren voor de onderzochte thiofosfonaten. Toch blijft het wenselijk deze te toetsen met enkele experimenteel bepaalde verdelingscoëfficiënten. Daarom werd de k/l -waarde en de corresponderende π -waarde voor de sub-

stituent experimenteel bepaald voor een vijftal verbindingen.

b. Bepalingsmethode

De bepaling van verdelingscoëfficiënten is vrij eenvoudig (32). In principe zijn alle methodes analoog, alleen de instrumentele bepalingsmethode verandert naargelang het te onderzoeken produkt.

Een bepaalde hoeveelheid pesticide wordt opgelost in het apolair oplosmiddel. Hierbij wordt éénzelfde hoeveelheid polair oplosmiddel gevoegd en de twee fazen worden intens gemengd. Om emulsievorming bij het mengen van deze twee fazen te voorkomen worden soms anti-emulgerende stoffen toegevoegd of gecentrifugeerd. Na scheiden der fazen wordt de concentratie van het pesticide bepaald in één der fazen. Alles hangt af van de nauwkeurigheid en de gevoeligheid der detectiemethodes en van de mate waarin beide solventen onderling oplosbaar zijn. Om dit laatste te voorkomen worden voorafgaandelijk beide oplosmiddelen met elkaar verzaadigd. De twee bijzonderste detectiemethoden zijn gaschromatografie (34) en radiotracermethodes (35). Niettegenstaande tracertechnieken uiterst gevoelig zijn bieden ze enkele nadelen vergeleken met gaschromatografie :

- bepaalde onzuiverheden en hydrolyseprodukten kunnen aanleiding geven tot foutieve resultaten, dit in tegenstelling met de gaschromatografische bepaling waar de onzuiverheden gescheiden worden van het te bepalen produkt.
- de gaschromatografische bepaling is eenvoudiger uit te voeren en vergt geen radioactief gemerkte produkten.

Speciaal in het geval van organofosfor-insekticiden kan ook gebruik gemaakt worden van de enzymatische bepaling met acetylcholinesterase (28) zoals beschreven in hoofdstuk IV. Dit is een interessante hulp daar bij de gaschromatografische methode de apolaire (organisch solvent) faze en met de enzymatische methode de polaire (water) faze onderzocht wordt.

Wanneer uiterst geringe hoeveelheden van de te verdelen stof oplost in een der fazen zijn de bekomen waarden zeer benaderend wegens de grote invloed van de fout der detectiemethode.

Bij een verschil tussen een k -waarde van 0.01 (bijvb. 0.99 en 0.98) is het inderdaad moeilijk uit te maken of dit te wijten is aan de experimentele nauwkeurigheid of een significant verschil. Doch dit gering verschil geeft k/l -waarde van resp. 99 en 49. Daarom zijn hoge en lage verdelingscoëfficiënten weinig betrouwbaar en zal men overgaan tot andere vormen van verdelingskonstanten zoals dunnelaagchromatografische of gaschromatografische.

c. Resultaten en bespreking

Wegens de zeer geringe wateroplosbaarheid van de onderzochte thiofosfonaten worden zeer hoge k -waarden bekomen. Daar deze extreme k -waarden een grote invloed hebben op de afgeleide k/l en π -waarden geeft de gaschromatografische bepaling nog niet de gewenste gevoeligheid. Er werd getracht dit te verhelpen door de bepalingen in vijfvoud uit te voeren en het gemiddelde te nemen. Dit werd uitgevoerd op vier verbindingen waarvan de substituenten op fenoxiazijnzuur uiteenlopende π -waarden gaven, namelijk de ongesubstitueerde molekulen en de p -methyl, p -nitro- en p -cyanoderivaten. Dat de bekomen π -waarden kwalitatief wel enige betekenis hebben blijkt uit de gelijkenis met de π -waarden bij fenoxiazijnzuur (31) zoals aangetoond in tabel 11. Wegens deze analogie en wegens de onnauwkeurigheid van deze methode werden verder geen experimentele π -waarden bepaald en werden uitsluitend de π -waarden, bekomen met gesubstitueerde fenoxiazijnzuurderivaten, aangewend in deze studie.

2. DE ΔR_M -WAARDEN

a. Definitie

De rechtstreekse bepaling van de verdelingscoëfficiënt k/l biedt dikwijls praktische moeilijkheden, vooral in het geval dat de verbinding weinig oplosbaar is in één van de twee fazen. Om deze problemen te omzeilen suggereerden Boyce en Milborrow (36) het aanwenden van chromatografische R_M -waarden.

Deze R_M -waarde werd door Bate-Smith en Westfall (37) ingevoerd als $\log (1/R_f - 1)$ naar aanleiding van Martin's vaststelling

TABEL 11 : Bepaling van verdelingscoëfficiënten en π -waarden

Nr	Substituent	k - waarden					k-gemiddel- de	k/l-waarde	π -waarde	π fenox- yazijnzuur
		a	b	c	d	e				
4a	H	0,99	0,98	0,98	0,98	0,99	0,984	61,50	0,000	0,000
4d	4 - CH ₃	1,00	1,00	0,99	0,99	1,00	0,996	166,00	0,421	0,520
4m	4 - CN	0,97	0,97	0,97	0,98	0,97	0,972	34,72	-0,248	-0,320
4p	4 - NO ₂	0,99	0,99	1,00	0,99	0,98	0,990	99,00	0,207	0,240

(38) dat de R_f -waarden bij vloeistof-vloeistof verdelingschromatografie in verband staan met de verdelingscoëfficiënt k/l tussen deze twee vloeistoffen overeenkomstig vgl. 7:

$$k/l = K \cdot \log(1/R_f - 1) \quad (\text{vgl. 7})$$

Analoog met de π -waarde van Fujita (31) voor de verdelingscoëfficiënten kan ΔR_M gedefinieerd worden als:

$$\Delta R_M = R_M(X) - R_M(H) \quad (\text{vgl. 8})$$

waar X en H refereren naar resp. een gesubstitueerde en de ongesubstitueerde molekulen van een analoge reeks. Het is dus goed mogelijk de π -waarde te vervangen door de ΔR_M -waarde. Deze ΔR_M -waarden bieden enkele belangrijke voordelen:

1. Snelle en eenvoudige uitvoering van de bepaling.
2. Grotere precisie, vooral bij produkten met uiterste k/l -waarden. Door het bestaan van een lineair verband tussen de R_M -waarde en de samenstelling van de mobiele fase kan men steeds een geschikt loopmiddelenstelsel kiezen dat goede R_f -waarden geeft.
3. Het is mogelijk de R_M -waarde van minder zuivere produkten te bepalen daar de produkten gescheiden worden bij het chromatograferen.
4. Vergt weinig produkt.
5. Men vermijdt het aanwenden van soms moeilijke kwantitatieve detectietechnieken.

b. Bepalingsmethode

Vloeistof-vloeistof verdelingschromatografie kan best uitgevoerd worden met de techniek van de "reversed-phase"-dunne-laagchromatografie (39). Deze techniek bestaat erin de stationaire fase (meestal silicagel) te impregneren met een lipiede fase (zoals siloconeolie, paraffine, e.d.m.) en daarna de gespotte produkten te chromatograferen met hydrofiele loopmiddelen (water, aceton, azijnzuur). De keuze van beide fazen is arbitrair zodat men een stelsel kan uitzoeken waar de R_f -waarden het best gespreid liggen en een lineair verloop hebben

(tussen 0.2 en 0.8).

Draber (40) vond een zeer interessante relatie tussen de R_M -waarden op polyamide-TLC platen en met reversed-phase TLC. Het is gekend dat bij polyamide-chromatografie het scheidend vermogen vooral afhankelijk is van de waterstofbindingskrachten tussen hydroxylgroepen in fenolische verbindingen en de -CONH-groepen in de polyamidemolekulen (41). Ook specifieke interacties tussen aromatische nitrogroepen en polyamidemolekulen spelen een belangrijke rol (42). Draber's waarnemingen gebeurden echter op een zeer homogene reeks 1, 2,4-triazinonen waar de waterstofbindingsenergie weinig veranderingen ondergaat zodat met dit verband met reverse-phase chromatografie wel zeer voorzichtig dient te worden omgesprongen. De chemische structuur van organofosforpesticiden bevat veel "bruggen" zoals -O-, -S-, P=S en P=O. Elke zuurstof- of zwavelatoom in deze brugsystemen kan, in min of meerdere mate, betrokken worden bij waterstofbindingen met de -CONH-groepen van de polyamidemolekule. Het zou dus goed mogelijk zijn dat de ΔR_M -waarden bekomen door polyamide-TLC interessante gegevens kunnen geven omtrent deze hydrofobe krachten, die eveneens een grote rol spelen in biologische systemen.

De keuze van de chromatografische omstandigheden moet in overeenstemming zijn met de natuurlijk voorkomende hydrofiele en lipofiele fasen in het organisme. Water is een membraan- en protoplasmabestanddeel, zodat het aanwenden ervan als hydrofiele fase van het model vanzelfsprekend is. Wegens de complexe lipoidale samenstelling van de celmembranen is de keuze van de hydrofobe fase heel wat moeilijker. Thermodynamisch beschouwd mag deze geen kwalitatieve invloed hebben op de resultaten zolang dat krachten zoals waterstofbindingen moeten afwezig zijn. Experimenten van Collander (43), welke aantoonde dat de verdelingscoëfficiënten tussen bv. ether/water en olijfolie/water zeer analoog verliepen, wijzen er echter op dat de keuze van de lipiede fase helemaal niet zo kritisch is als zou verwacht worden. In deze studie werd vloeibare paraffine gekozen als lipiede en als hydrofiele fase aceton/water (6:4 v/v). Ter vergelijking werd eveneens polyamide-TLC uitgevoerd met aceton/water (6:4 v/v) en n.hexaan/azijnzuur (95/5 v/v) dit om een breed bereik in polariteit te kunnen beschouwen.

TABEL 12 : R_F -, R_M - en ΔR_M -waarden volgens drie verschillende TLC-systemen.

Nr	Substituent	Reversed phase TLC acetone/water (6:4 v/v)			Polyamide TLC Hexaan/HAc (95:5 v/v)			Polyamide TLC Acetone/water (6:4 v/v)		
		R_F	R_M	ΔR_M	R_F	R_M	ΔR_M	R_F	R_M	ΔR_M
a	H	0,467	0,059	0,000	0,761	-0,503	0,000	0,355	0,259	0,000
b	2 - CH ₃	0,397	0,182	0,123	0,799	-0,599	-0,096	0,324	0,319	0,060
c	3 - CH ₃	0,414	0,151	0,092	0,770	-0,525	-0,220	0,321	0,325	0,066
d	4 - CH ₃	0,412	0,154	0,096	0,777	-0,547	-0,039	0,294	0,380	0,181
e	2 - OCH ₃	0,515	-0,026	-0,085	0,638	-0,244	0,257	0,414	0,151	-0,109
f	3 - OCH ₃	0,481	0,033	-0,026	0,684	-0,335	0,168	0,391	0,193	-0,067
g	4 - OCH ₃	0,489	0,019	-0,040	0,658	-0,284	0,219	0,370	0,231	-0,028
h	2 - Cl	0,411	0,156	0,097	0,717	-0,404	0,099	0,295	0,378	0,197
i	3 - Cl	0,348	0,273	0,214	0,769	-0,523	-0,019	0,260	0,454	0,195
j	4 - Cl	0,355	0,259	0,201	0,770	-0,525	-0,022	0,244	0,491	0,232
k	2 - CN	0,559	-0,103	-0,162	0,502	-0,003	0,499	0,446	0,094	-0,165
l	3 - CN	0,508	-0,014	-0,073	0,484	0,028	0,531	0,412	0,154	-0,105
m	4 - CN	0,523	-0,040	-0,099	0,429	0,124	0,627	0,373	0,226	0,034
n	2 - NO ₂	0,525	-0,043	-0,102	0,496	0,007	0,510	0,408	0,162	-0,098
o	3 - NO ₂	0,444	0,098	0,039	0,517	-0,030	0,473	0,324	0,319	0,060
p	4 - NO ₂	0,428	0,126	0,067	0,486	0,024	0,527	0,282	0,406	0,147
q	4 - F	0,441	0,103	0,044	0,733	-0,439	0,064	0,345	0,279	0,019
r	4 - Br	0,331	0,306	0,247	0,763	-0,508	-0,049	0,208	0,581	0,327
s	4 - I	0,299	0,370	0,317	0,707	-0,383	0,120	0,174	0,676	0,417
t	4 - C ₂ H ₅	0,337	0,294	0,235	0,807	-0,621	-0,118	0,246	0,486	0,227
u	4-n C ₃ H ₇	0,270	0,432	0,373	0,835	-0,704	-0,201	0,198	0,608	0,348
v	2,4-di Cl	-	-	-	-	-	-	-	-	-
w	2,3,4,5,6 penta Cl	-	-	-	-	-	-	-	-	-
x	2,5 di Cl 4 Br	0,215	0,562	0,504	0,751	-0,479	0,024	0,114	0,891	0,631
y	4-CN (Me)	0,567	-0,117	-0,176	0,287	2,374	0,877	0,409	0,160	-0,099
z	4-CN (n-prop)	0,446	0,094	0,035	0,498	0,003	0,506	0,321	0,325	0,066
4'	x (P=O)	0,146	0,767	0,708	0,907	-0,987	-0,484	0,096	0,974	0,715

c. Resultaten en bespreking

De R_f - en afgeleide R_M - en ΔR_M -waarden van de reversed-phase TLC en de polyamide-TLC zijn samengebracht in tabel 12.

Duidelijk blijkt het verschil in polariteit tussen de twee aangewende loopmiddelen bij de polyamide-TLC. De R_f -waarden verlopen tegenovergesteld bij de beide loopmiddelen. Dit wordt verduidelijkt in tabel 13, waar tevens de gelijkenis van de polyamide-TLC en de reversed phase-TLC met gelijke loopmiddelen geïllustreerd wordt.

TABEL 13 : Vergelijking van de R_f -waarden bekomen volgens drie verschillende TLC-systemen

Funktionele groep	Voorbeeld	Rf-waarden		
		Polyamide TLC		Rev.phase TLC
		Hex/HAc 95/5	Ac./H ₂ O 6/4	Ac./H ₂ O 6/4
$R^2 = \text{Me, Et, n-Prop}$	m, y, z	Me < Et < n-Prop	n-Prop < Et < Me	n-Prop < Et < Me
$R^1 = \text{H, Me, Et, n-Prop}$	a, d, t, u	H < Me < Et < n-Prop	n-Prop < Et < Me < H	n-Prop < Et < Me < H
P=S of P=O	x, 4'	P=S < P=O	P=O < P=S	P=O < P=S
$R^1: \text{O-, m-, p-subst.}$		varieert doch neiging: $p \leq o \leq m$		varieert doch neiging: $m \leq p < o$
R^1 : Halogeen	y, q, r, s	I < F < Br < Cl	I < Br < Cl < F	I < Br < Cl < F

3. DE π_{GLC} -WAARDEN

a. Definitie

Ook gaschromatografie is een verdelingsproces tussen een gas-faze en een stationaire faze. Bij een gaschromatografische scheiding is de relatieve retentietijd van een gesubstitueerde molecule X (t_x) ten opzichte van de ongesubstitueerde H (t_H) van een analoge reeks verbindingen gelijk aan de verhouding

van de verdeling van beide molekulen tussen de gasfaze en de stationaire faze;

$$\text{dus } R_{f_{X,H}} = \frac{t_X}{t_H} = \frac{\text{verdeling van X tussen gasfaze en stationaire faze}}{\text{verdeling van H tussen gasfaze en stationaire faze}} \quad (\text{vgl. 9})$$

In analogie met vgl. 6 kan men eveneens een π_{GLC} -waarde invoeren als:

$$\pi_{\text{GLC}} = \log R_{f_{X,H}} \quad (44) \quad (\text{vgl. 10}).$$

b. Bepalingsmethode

De stationaire fazen kunnen geklassificeerd worden naar hun polariteit, gebruik makend van de tabellen van McReynolds (45). De keuze viel op drie veel gebruikte stationaire fazen met verschillende polariteit nl. DEGS (polair), OV-101 (apolair) en OV-225 (intermediair).

Als dragerstof werd chromosorb W genomen waarop 3 % (w/w) van de stationaire faze aangebracht werd.

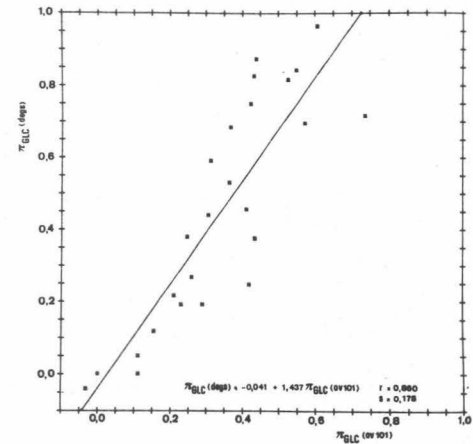
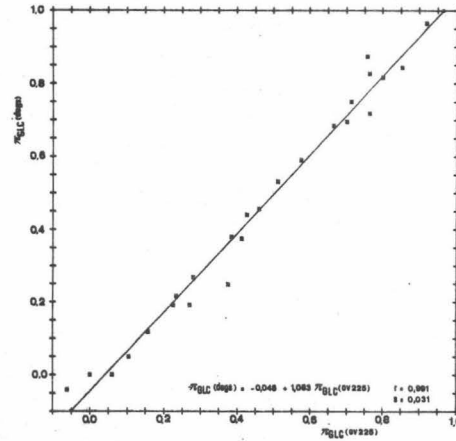
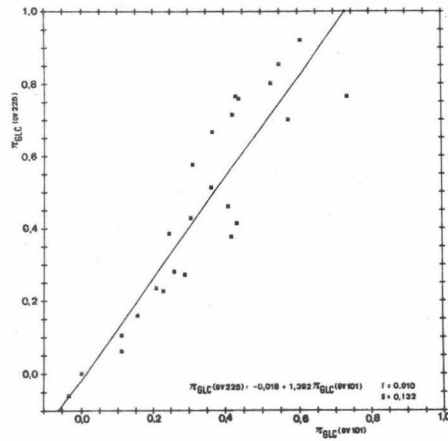
c. Resultaten en bespreking

De resultaten zijn samengevat in tabel 14. De drie verschillende stationaire fazen hebben slechts geringe invloed op de sekwentie van de organofosforverbindingen zoals blijkt uit fig. 15. Alleen de absolute retentietijden zijn verschillend. Zo is de retentietijd bij analoge proefomstandigheden voor het p-nitroderivaat 4p bij OV 225 (+ 30 min) groter dan bij DEGS (25 min) en bij OV-101 (18 min).

TABEL 14 : Gaschromatografische R_f - en π_{GLC} -waarden op drie verschillende kolommen

		OV101		OV225		DEGS	
		$R_{F,R,H}$	π_{GLC}	$R_{F,R,H}$	π_{GLC}	$R_{F,R,H}$	π_{GLC}
a	H	1,00	0,000	1,00	0,000	1,00	0,000
b	2 - CH ₃	1,29	0,111	1,15	0,061	1,00	0,000
c	3 - CH ₃	1,29	0,111	1,27	0,104	1,12	0,049
d	4 - CH ₃	1,43	0,155	1,44	0,158	1,31	0,117
e	2 - OCH ₃	1,76	0,246	2,42	0,384	2,39	0,378
f	3 - OCH ₃	2,02	0,306	2,67	0,427	2,75	0,439
g	4 - OCH ₃	2,31	0,364	3,24	0,511	3,39	0,530
h	2 - Cl	1,62	0,210	1,71	0,233	1,64	0,215
i	3 - Cl	1,70	0,230	1,68	0,225	1,55	0,190
j	4 - Cl	1,82	0,260	1,90	0,279	1,85	0,267
k	2 - CN	2,05	0,312	3,75	0,574	3,88	0,589
l	3 - CN	2,33	0,367	4,61	0,664	4,82	0,683
m	4 - CN	2,70	0,431	5,80	0,763	6,70	0,826
n	2 - NO ₂	2,64	0,422	5,15	0,712	5,61	0,749
o	3 - NO ₂	3,36	0,526	6,29	0,799	6,55	0,816
p	4 - NO ₂	4,04	0,606	8,29	0,919	9,21	0,964
q	4 - F	0,93	-0,032	0,87	-0,061	0,91	-0,041
r	4 - Br	2,57	0,410	2,88	0,459	2,85	0,455
s	4 - I	3,73	0,572	5,00	0,699	4,94	0,694
t	4 - P ₂ H ₅	1,95	0,290	1,86	0,270	1,55	0,190
u	4-n prop	2,62	0,418	2,37	0,375	1,76	0,246
v	24 di Cl	2,71	0,433	2,58	0,412	2,36	0,373
w	penta Cl	-	-	-	-	-	-
x	2,5 di Cl ₄ Br	5,45	0,736	5,79	0,763	5,21	0,717
y	4-CN (Me)	2,75	0,439	5,71	0,757	7,47	0,873
z	4-CN (n-prop)	3,53	0,548	7,12	0,852	6,97	0,843
4'	x(P=O)	-	-	-	-	-	-

Figuur 15 : Verband tussen de π_{GLC} -waarden bekomen met drie
verschillende stationaire fazen.



HOOFDSTUK IV : BIOCHEMISCHE EIGENSCHAPPEN VAN O-ALKYL-O-ARYL =====

FENYLFOSFONOTHIOATEN =====

In 1914 bestudeerde Dale (46) de invloed van choline-esters op de bloedsomloop bij de kat. Hij konstateerde het typische "choline-effect", nl. veranderend hartritme, verlaagde bloeddruk en een regelmatige produktie van acetylcholine in het bloed wat verband had met de hydrolyse van het acetylcholine. Hij postuleerde dat dit te wijten was aan de werking van een esterase dat de aktieve estermolekulen op een of andere wijze verwijdt uit het bloed. Dit acetylcholine-hydrolyserend enzyme, het acetylcholinesterase, werd sindsdien in verschillende diersoorten aangetoond. Toch moest gewacht worden tot de ontdekking van de interessante eigenschappen van sommige organische fosforverbindingen om een intensieve studie van de cholinesterasen terug te vinden, alhoewel moet aangestipt worden dat de inhibitie van acetylcholinesterase door fysostigmine en diisopropyl-fosforofluoridaat reeds vroeger aangetoond werd (47, 48). Metcalf en March (49) toonden in 1949 aan dat de insekticide werking van organofosforverbindingen en carbamaten uitsluitend te wijten is aan hun anticholinesterase-aktiviteit. Sindsdien is de werking van deze verbindingen grondig bestudeerd.

1. CHOLINESTERASEN : DEFINITIE EN PREPARATEN

Cholinesterasen (ChE) zijn een groep esterase-enzymen die choline-esters sneller hydrolyseren dan andere esters. Alle cholinesterasen, uitgezonderd deze van enkele kleine gewervelde en ongewervelde dieren, worden geïnhibeerd door fysostigmine (10 μ M). Deze inhibitie-eigenschap en de substraatspecificiteit onderscheiden cholinesterase van carboxyesterasen (EC 3.1.1.1) (50), alhoewel beide esterase-types gevoelig zijn voor organofosforverbindingen. Er bestaat een grote analogie tussen deze beide enzymen zoals hun reactiemechanisme en de inhibitiewerking van fosforyl-, carbamyl-, en sulfonylderivaten. Beide esterasen reageren met het ester tot een intermediair acyl-enzyme complex dat verder kan reageren met een ganse reeks acyl-accept-

toren (waaronder water).

Naargelang de aard der specifieke substraten en de selectieve inhibitoren kan men de cholinesterasen arbitrair indelen in twee hoofdgroepen, nl. de acetylcholine acetylhydrolasen (EC. 3.1.1.7) en de acylcholine acylhydrolasen (EC. 3.1.1.8), meestal echter vernoemd als resp. acetylcholinesterase en cholinesterase (51).

a. Acetylcholinesterase (AChE)

De best gekende cholinesterase hydrolyserende enzymes zijn de acetylcholinesterasen die acetylcholine als natuurlijk substraat hebben. AChE heeft een grote substraatspecificiteit zodat volgende criteria gebruikt worden om dit enzyme te definiëren (52) :

1. AChE hydrolyseert acetylcholine of het thio-analoog, acetylthioline, met een veel grotere snelheid dan de andere choline-esters.
2. AChE heeft een welbepaalde optimale substraatconcentratie, d.w.z. dat er substraatinhibitie optreedt als acetylcholine of het thio-analoog gebruikt wordt als substraat.
3. Bij gebruik van acetylcholine als substraat is er een bepaald pH-optimum.
4. AChE is gevoelig voor lage concentraties fysostigmine.
5. AChE komt vooral voor in hersencellen, zenuwcellen en erythrocyten. In de elektrische energie-verwekkende organen van de sidderaal (Electrophorus electricus) en in sommige slangengiften komt het in vrij grote concentraties voor. Qua specificiteit en kinetische eigenschappen zijn deze enzymen van verschillende oorsprong erg op elkaar gelijkend.

b. Cholinesterasen (ChE)

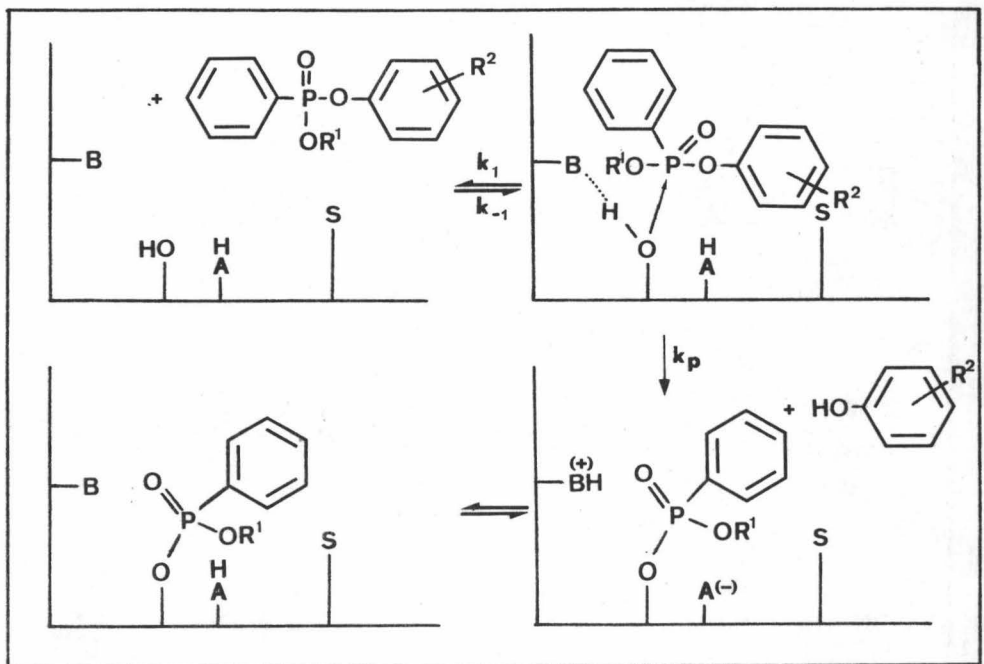
Cholinesterasen zijn vooral aanwezig in het bloedplasma van hogere vertebraten (vandaar de benaming "plasma cholinesterase"), doch ook in andere organen zoals lever, pancreas, hart, spieren enz.... Deze enzymen zijn wel substraatspecifiek zodat een onderscheid kan gemaakt worden in butyrylcholinesterase (BuChE),

propionylcholinesterasen (PrChE) en benzoylcholinesterasen (BzChE), alhoewel dergelijke klassificatie eerder empirisch is. Hier zijn wel opvallende verschillen onder de diersoorten. Zo bevat het plasma van ratten, konijnen, kuikens en kikkers hoofdzakelijk PrChE, terwijl in het plasma van paarden, honden en de mens vooral BuChE aanwezig is. Maar ook onderling verschillen deze enzymen nog qua inhibitorgevoeligheid en kinetische eigenschappen (51).

2. WERKING VAN ORGANOFOSFORVERBINDINGEN OP CHOLINESTERASEN

De inaktivatie van acetylcholinesterase (AChE) door organofosfor-esters gebeurt door een chemische reactie van de fosforverbinding met het enzyme (52, 54). Het volledig inhibitieproces eindigt met de vorming van een covalent gebonden gefosforyleerd enzyme zoals geïllustreerd door fig. 16.

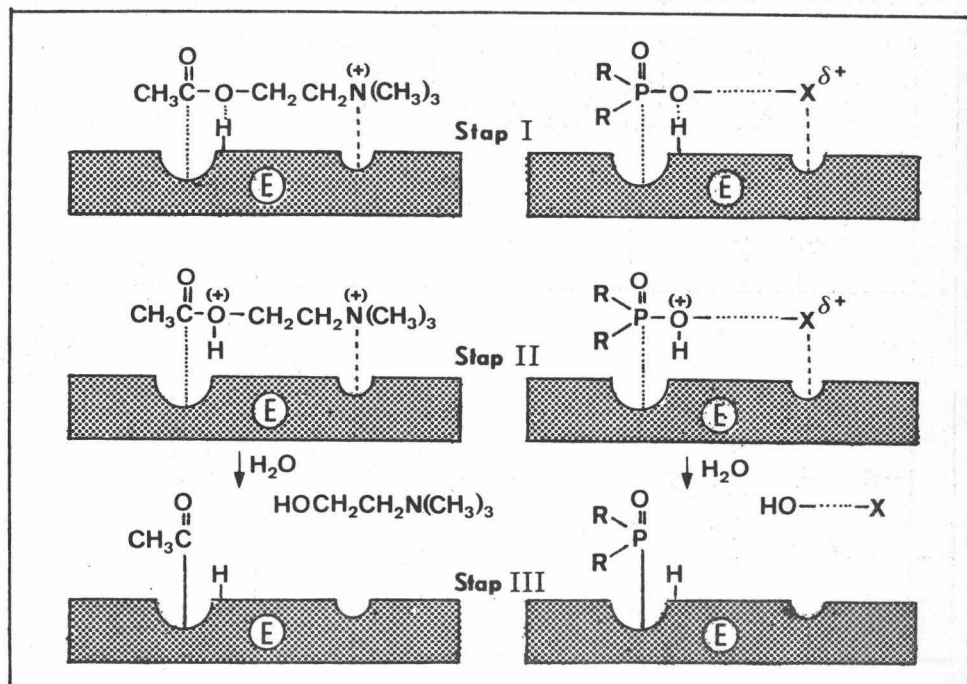
Figuur 16. : Inhibitiereductie van AChE door een organofosfor-verbinding.



Het ester en het enzyme vormen eerst een complex (Stap I), gevolgd door een fosforylatie-reactie (stap II). Als model voor de actieve plaats van AChE werd dit voorgesteld door Krupka (55) aangewend. In dit schema is B een basische groep (de histidine imidazol-stikstof), OH is de serine-hydroxyl, HA is een zure groep (tyrosine-hydroxyl) en S is de anionische plaats. De anionische plaats, die normaal als functie heeft het trimethylammoniumgedeelte van het natuurlijk substraat acetylcholine aan te trekken, kan voorgesteld worden als een gelokaliseerde, negatief geladen elektronenwolk welke kan interfereren met eventuele positieve groepen of ladingen op of rond de meta-positie van de fenoxyring van de organofosforverbinding.

Een der meest opvallende kenmerken van de organofosforinsecticiden is hun structurele complementariteit met de cholinesterase-molekule. Ze bezetten op een analoge wijze de actieve plaatsen van het enzyme als het natuurlijk substraat van AChE, het acetylcholine. Vereenvoudigd kan dit als volgt worden voorgesteld :

Figuur 17 : De verschillende reaktiestappen bij het inhibitieproces van AChE.



In de eerste stap wordt het acylkoolstofatoom en het choline-stikstofatoom van het acetylcholine coulombisch gebonden terwijl bij de organofosformolekule op een analoge wijze het fosforatoom en een of andere kationisch deel van de zijketen gecomplexeerd worden.

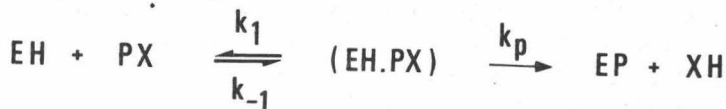
In een tweede stap wordt een waterstofatoom van de estergroep gebonden op het cholinegedeelte van acetylcholine of op de -O-X groep van de organofosforverbinding. Deze processen noemt men resp. acylatie en fosforylatie :

"Fosforylatie" van AChE kan zowel aanleiding geven tot de vorming van $RO(R)PO-E$ als $(RO)_2PO-E$ naargelang de inhibitor $RO(R)POX$ of $(RO)_2POX$ is. In het eerste geval zou men echter moeten spreken van "fosfonylatie", doch daar de eigenschappen in beide gevallen gelijk zijn wordt de term "fosforylatie" ook voor fosfonaten gebruikt.

In stap III kan het geacetyleerd of gefosforyleerd enzyme verdere veranderingen ondergaan onder invloed van het waterig milieu waardoor gehydroxyleerde verbindingen gevormd worden.

De laatste stap (stap IV) is de enige waar de analogie tussen acetylcholine en organofosforverbindingen ophoudt. Deze stap is in feite de oorzaak van de inhiberende werking van organofosforverbindingen. Het deacylateringsproces tot vrij enzyme gebeurt zeer snel terwijl de defosforylatie (of reaktivatie) uiterst traag gebeurt en de receptor van het AChE lange tijd bezet blijft (fig. 18).

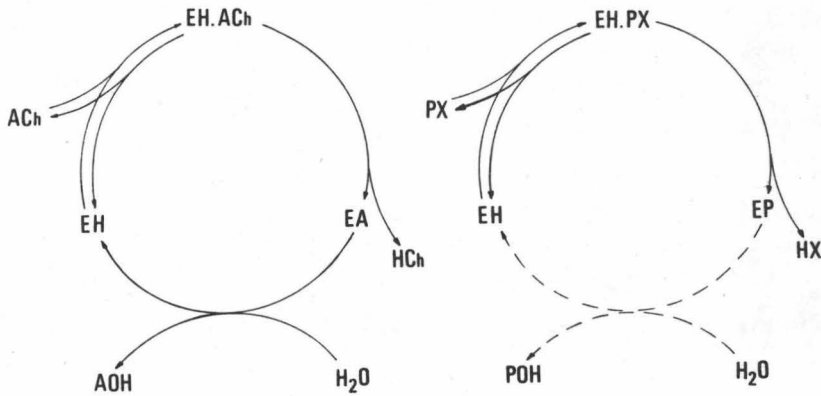
De inhibitiesnelheid van AChE is zeer afhankelijk van de eerste stap in de kringloop waar de affiniteit tussen PX en EH een zeer grote rol speelt :



De affiniteit kan uitgedrukt worden als $K_a = \frac{k_{-1}}{k_1}$

Het is gebleken dat voor de meeste organofosforverbindingen de complexvorming (stap I) slechts zeer weinig invloed ondergaat

Figuur 18 : Schematische weergave van een normale AChE-cyclus en van een inhibitiereactie.



van k_p zodat het evenwicht tussen EH, PX en EH.PX voorgesteld kan worden als :

$$\frac{[EH][PX]}{[EH.PX]} = \frac{k_{-1}}{k_1} = K_a \quad (\text{vgl. 11})$$

3. KINETIEK VAN DE INHIBITIEREAKTIE TUSSEN ORGANOFOSFORVERBINDINGEN EN CHOLINESTERASEN

De inhibitiesnelheid wordt uitgedrukt als :

$$\frac{d[EP]}{dt} = k_p [(EH.PX)] = \frac{k_1 \cdot k_p}{k_{-1}} [EH][PX] \quad (\text{vgl. 12})$$

of

$$\frac{d[EP]}{dt} = k_i [EH][PX] \quad (\text{vgl. 13})$$

De oorspronkelijke enzymeconcentratie $[E_0H]$ stemt overeen met :

$$[E_0H] = [EH] + [(EH.PX)] + [EP] \quad (\text{vgl. 14})$$

In de veronderstelling dat $[EH] \gg [(EH.PX)]$ en dat de reactie onmiddellijk verder gaat tot de vorming van EP zoals aange-
toond door Aldridge (56) bekomt men :

$$[EH] = [E_0H] - [EP]$$

$$\text{zodat} \quad \frac{d[EH]}{dt} = - \frac{d[EP]}{dt} \quad (\text{vgl. 15})$$

Substitutie van vlg. 15 in vgl. 13 geeft

$$- \frac{d[EH]}{dt} = k_i [EH][PX] \quad (\text{vgl. 16})$$

Vergelijking 16 is typisch voor een bimoleculaire reactie :

$$- \frac{d[EH]}{[EH]} = k_i [PX] dt \quad (\text{vgl. 17})$$

Integratie tussen tijden 0 en t en enzymeconcentraties a en a-x (voor resp. tijden 0 en t) geeft :

$$- \int_{a-x}^a \frac{d[EH]}{[EH]} = k_i [PX] \int_t^0 dt \quad (\text{vgl. 18})$$

$$\text{of} \quad \ln \frac{a}{a-x} = k_i [PX] t \quad (\text{vgl. 19})$$

$$\text{of} \quad k_i = \frac{1}{[PX] t} \ln \left(\frac{a}{a-x} \right) \quad (\text{vgl. 20})$$

$$\text{of} \quad k_i = \frac{2,3}{t[PX]} \log \left(\frac{a}{a-x} \right) \quad (\text{vgl. 21})$$

In vergelijking 21 is a de oorspronkelijke enzymeaktiviteit en x de aktiviteit na inhibitie gedurende t minuten. k_i is dus de bimoleculaire snelheidskonstante. De verhouding $a/(a-x)$ kan

ook omschreven worden als $100/P$ met P de procentuele restactiviteit na tijd t .

$$\text{dus} \quad k_i = \frac{2,3}{t[PX]} \log \left(\frac{100}{P} \right) \quad (\text{vgl. 22})$$

$$\text{of} \quad k_i = \frac{2,3}{t[PX]} (2 - \log P) \quad (\text{vgl. 23})$$

Door $[PX]$ te vervangen door de meer gebruikelijke term i als initiële inhibitorconcentratie bekomt men

$$\log P = 2 - \frac{k_i i}{2,3} t \quad (\text{vgl. 24})$$

Deze bimoleculaire snelheidskonstante is dus een waarde voor de sterkte van de organofosforinhibitor, in de veronderstelling dat de reactie van pseudo-eerste orde is.

Een andere manier om dit uit te drukken is de bepaling van de concentratie die 50 % enzymremming veroorzaakt, de I_{50} -waarde. Het voordeel van deze I_{50} -waarde is dat ze onafhankelijk is van de enzymeconcentratie die in de meeste biologische preparaten moeilijk te meten is. Bovendien kan men zeer gemakkelijk de bimoleculaire konstante en de I_{50} -waarde van elkaar afleiden (53):

$$k_i = 0.695/I_{50}t \quad (\text{vgl. 25})$$

In analogie met pH-waarden van waterstofionenconcentraties is het negatief logaritme van I_{50} , de pI_{50} -waarde, eveneens een veel gebruikte term.

4. METHODEN VOOR DE BEPALING VAN CHOLINESTERASEN

a. Literatuuroverzicht

De eerste methodes om AChE te bepalen waren technisch vrij ingewikkeld. Zo was er een methode waarbij boterzuur, gevormd uit butyrylcholine, getitreerd werd (57). Een andere techniek bestond erin de produktie van azijnzuur te meten met een manometrische CO_2 bepaling (58).

Michel (59) voerde een elektrometrische methode in waarbij pH-veranderingen, veroorzaakt door het enzyme in standaardbufferoplossingen gedurende een bepaalde inkubatieperiode, gemeten werden. De aangewende buffers moeten voldoende zwak zijn om elektrometrische metingen van de azijnzuurvorming uit het substraat mogelijk te maken. Deze methode is nogal tijdrovend, wegens een 60 minuten durende inkubatieperiode, doch bleek zeer gevoelig en goed reproduceerbaar te zijn.

Kalow (60) mat de hydrolysesnelheid van benzoylcholine bij 240 nm doch deze techniek heeft het nadeel van een grote background-absorptie van het enzymepreparaat; daarenboven bleek het substraat gevoelig te zijn voor U.V.-licht.

Verschillende kolorimetrische methodes werden ontwikkeld door pH-indicatoren te gebruiken als middel om de enzymeaktiviteit te meten. Reinhold (61) publiceerde in 1953 een methode met fenolrood als indikator. Gerard (62) gebruikte broomthymolblauw als indikator en acetylcholinechloride als substraat.

Op hetzelfde principe ontwikkelde Fleish (63) een zeer eenvoudige methode welke geen apparatuur vereist en zeer gemakkelijk uitvoerbaar is. In deze proef maakt men gebruik van papierstroompjes, geïmpregneerd met acetylcholine en broomthymolblauw. De tijd nodig om een kontrolekleur te bekomen is een maat voor de enzymeaktiviteit. Deze "AChotest" is semi-kwantitatief doch blijkt zeer interessant voor snelle screenings.

Een aantal kolorimetrische substraatsbepalingsmethoden werden uitgetest om cholinesterase te bepalen. Main (64) mat de o-nitrofenolvorming afkomstig van o-nitrofenolbutyraat. Morrow en Motulsky (65) ontwikkelden een methode waarbij een diazo-kleurstof aangewend werd om α -naftylacetaat te meten, doch het substraat was niet specifiek zodat ook andere esterasen deelnamen aan de hydrolyse. Ellman (66) gebruikte acetylthiocholine als substraat en DTNB (5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoëzuur) als kleurreegens. Het DTNB is een sulfhydrylgroepreegens en geeft met het thiocholine een gele kleur.

Rey & Hanss (67) ontwikkelden een ultramikrotechniek waarbij de conductiviteitsstijging gemeten wordt gedurende de hydrolyse van acetylcholine. Deze methode vereist een conductimetrische

cel en een ultrathermostaat. De resultaten worden bekomen binnen de drie minuten en zijn vergelijkbaar met deze van de veelgebruikte Ellman-methode. De nauwkeurigheid en de gevoeligheid worden niet gestoord door de kleur of de troebeling van het monster.

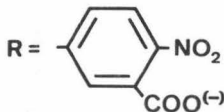
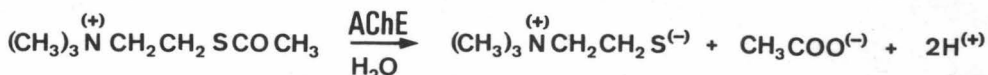
Gedurende de laatste jaren zijn een reeks specifieke chromogene substraten voor ChE beschreven, die het gebruik van een kleur-reagens zoals DTNB overbodig maken. Deze verbindingen zijn derivaten van 1,2-thiazolylazo-2-acetoxybenzeen (68). Om ze echter te kunnen gebruiken als substraat zijn eerst nog vergelijkende studies met de normale substraten nodig om hun analoge specificiteit aan te tonen.

Een elektrode gevoelig voor choline-esters, werd aangewend om zowel AChE als ChE met acetylcholine, butyrylcholine en acetyl- β -methylcholine als substraat te meten (69).

Een zeer gevoelige gaschromatografische methode werd ingevoerd door Cranmer en People (70). Ze is gebaseerd op de meting van 2,2-dimethyl-1-butanol (DMB), dat bekomen wordt door de enzymatische hydrolyse van het substraat 3,3-dimethyl butylacetaat (DMBA).

b. De Ellman-methode (66)

Het principe van de Ellman-methode berust op de meting van de hydrolysesnelheid van acetylthiocholine door het acetylcholinesterase. Het gevormde thiocholine reageert met 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzooat en resulteert in de vorming van een geel anion, het 5-thio-2-nitrobenzooat-ion :



De kleurvorming wordt gemeten bij 412 nm. De reactie met het thiol bleek voldoende snel te verlopen om niet limiterend te zijn voor de enzymatische bepaling en de aangewende concentraties hebben geen invloed op de enzymatische activiteit.

De Ellman-methode wordt dikwijls verkozen boven de vele andere methodes wegens enkele belangrijke voordelen die deze techniek biedt :

1. Eenvoudige uitvoering
2. Grote precisie en reproduceerbaarheid
3. Konstante zuurtegraad
4. Korte incubatietijden
5. Continue en konstante stijging van de kleurintensiteit in functie van de tijd
6. Meting van een reactieprodukt i.p.v. het resterend substraat
7. Mogelijkheid tot automatisering.

Deze methode bleek tot nu toe het best geschikt voor standardisatie zodat door Boehringer Mannheim GmbH een Test-combinatie (71) voor cholinesterase-bepalingen werd samengesteld en ge-commercialiseerd gebaseerd op de Ellman-methode. Deze methode kan zeer eenvoudig omgevormd worden tot een procedure om de remming van AChE te meten in aanwezigheid van een inhibitor.

De methode (72) voor ChE-bepaling bestaat erin de kleurvorming te volgen in functie van de tijd door twee kuvetten, de ene als testkuvet en de andere als referentie te vergelijken in een double-beam spectrofotometer. De samenstelling van beide oplossingen is als volgt :

Testkuvet	Referentiekuvet
1.0 ml substraat-oplossing	-
0.1 ml enzymepreparaat	0.1 ml enzymepreparaat
0.5 ml DTNB-oplossing	0.5 ml DTNB-oplossing
1 ml gedestilleerd water	2 ml gedestilleerd water

Het probleem stelt zich wat de samenstelling van de referentiekuvet moet zijn. Men kan ofwel het substraat elimineren, ofwel het enzyme. In beide gevallen bestaat de mogelijkheid dat bij het begin de absorptie van de testkuvet groter is dan deze van

de referentie daar in het ene geval reeds een minimum gele kleuring aanwezig is, te wijten aan de waterige hydrolyse van het substraat die men compenseert in de referentie, en in het andere geval de troebeling of de kleur van de enzymeoplossing niet gecompenseerd wordt. De voorkeur gaat naar de eliminatie van het substraat omdat uiteindelijk de thiolgroepen, gevormd bij de afbraak ervan, de kleurvorming teweegbrengen.

Om de remmende werking van organofosforverbindingen na te gaan worden verschillende concentraties van deze inhibitor toegevoegd als volgt :

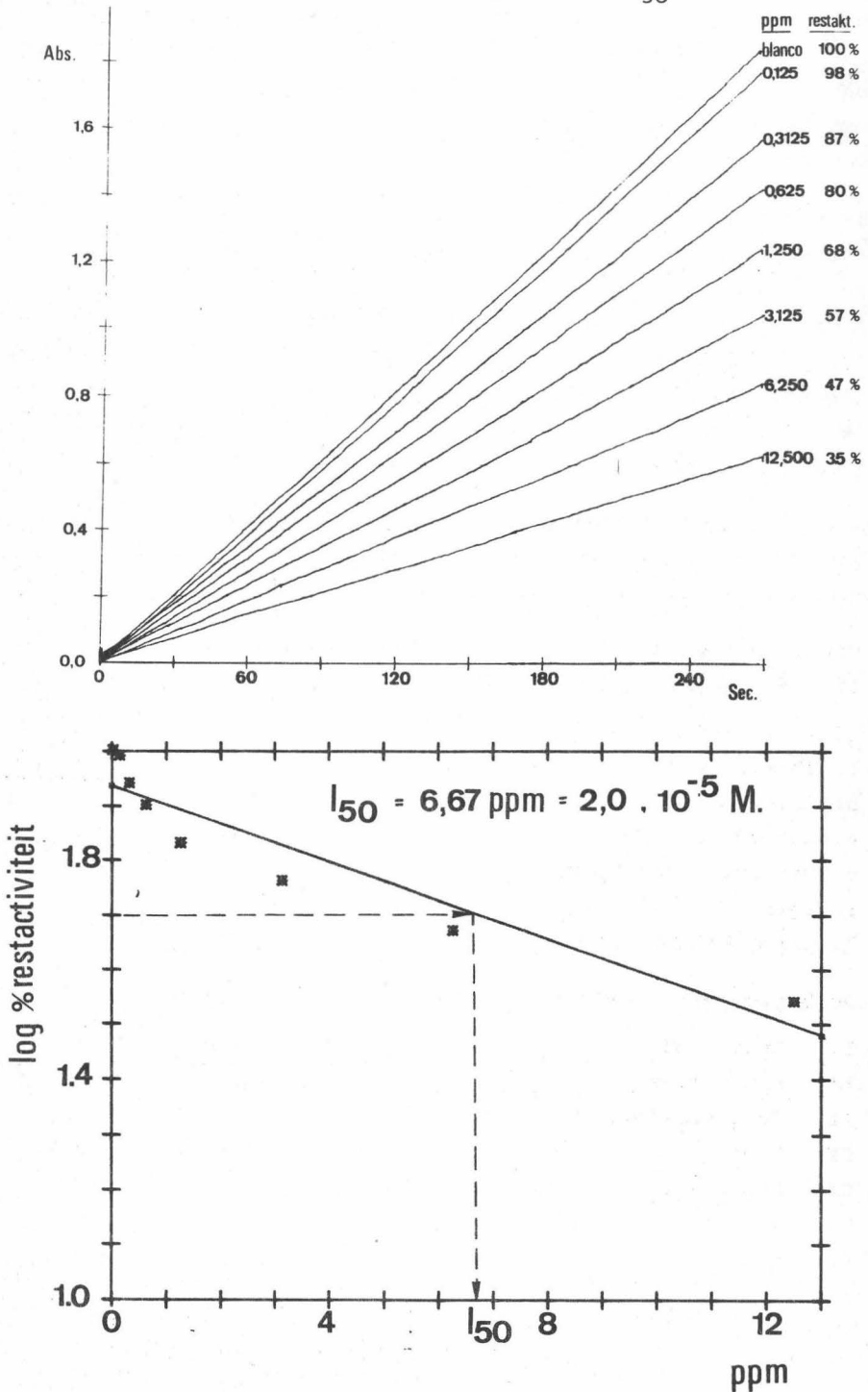
Testkuvet	Referentiekuvet
0,05 ml inhibitoropl. in aceton	0,05 ml inhibitoropl. in aceton
0,1 ml enzymepreparaat	0,1 ml enzymepreparaat
0,95 ml gedestilleerd water	1,95 ml gedestilleerd water
15 minuten incuberen bij 25°	
1,0 ml substraatoplossing	--
0,5 ml DTNB-oplossing	0,5 ml DTNB-oplossing

De kleine hoeveelheid aceton (50 μ l) bleek slechts een uiterst geringe invloed te hebben op de enzymatische activiteit zodat er geen belang werd aan gehecht. Wegens de aanwezigheid van de inhibitor blijkt dat de absorptiestijging minder steil verloopt in functie van de tijd (fig.19a). Deze verminderde enzymeactiviteit die daarmee gepaard gaat is dus te wijten aan de inhiberende werking van de fosforverbinding. Door deze proef te herhalen met verschillende inhibitorconcentraties kan men de restactiviteit (procentueel t.o.v. de oorspronkelijke activiteit zonder inhibitor) uitzetten t.o.v. de concentratie. Zo is het mogelijk de I_{50} -waarde grafisch te bepalen (fig.19b). Met de methode der kleinste kwadraten kan de I_{50} nauwkeuriger berekend worden.

c. Geautomatiseerde technieken

Geautomatiseerde bepalingen zijn zeer geschikt voor serieanalyses wegens de snelle uitvoering en de goede reproduceer-

Figuur 19 : De AChE-aktiviteit bij verschillende inhibitor-concentraties (4v), zoals bepaald met de normale Ellman-methode, en de grafische I_{50} -bepaling



baarheid. Daarenboven wordt een standardisatie in de behandelingen bekomen die onmogelijk te bereiken is met een manuele techniek. Dit is vooral het geval bij enzymatische methodes omdat het alle fouten van exacte timing der preïnhibitie- en incubatieperioden uitsluit. De bepaling van I_{50} -waarden eist zeer konstante proefomstandigheden omdat men uiteindelijk deze waarden vergelijkt.

Twee automatische bepalingstechnieken zijn ontwikkeld om ChE-activiteiten te bepalen. De eerste (73) berust op het meten van de kleurverandering van fenolrood-indikator veroorzaakt door het ontstaan van azijnzuur gedurende de enzymatische hydrolyse. De tweede werd ontwikkeld door Voss (74) en is gebaseerd op de Ellman-methode. Wegens de vele voordelen welke deze laatste biedt werd deze uitgewerkt in het laboratorium voor de I_{50} -bepaling van de fosfonaten.

AChE hydrolyseert acetylthiocholine tot azijnzuur en thiocholine. Dit laatste reduceert DTNB tot het geel anion van thionitrobenzoëzuur, dat kolorimetrisch bepaald wordt bij 420 nm.

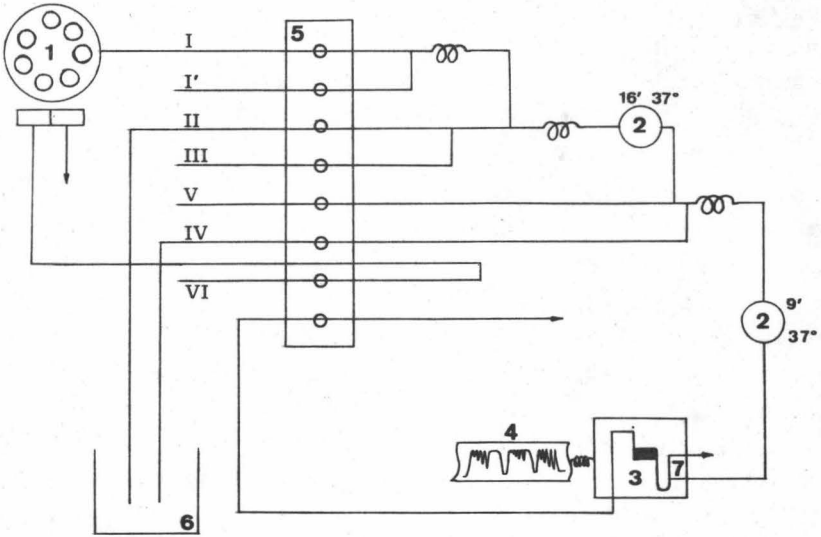
Het flow-diagram van de automatische methode is afgebeeld in fig. 20. De belangrijkste delen ervan zijn :

1. Monsterwisselaar
2. Thermostatisch bad met incubatiespiraal
3. Colorimeter
4. Recorder
5. Peristaltische pomp
6. Ijsbad
7. Ontluchtingssysteem

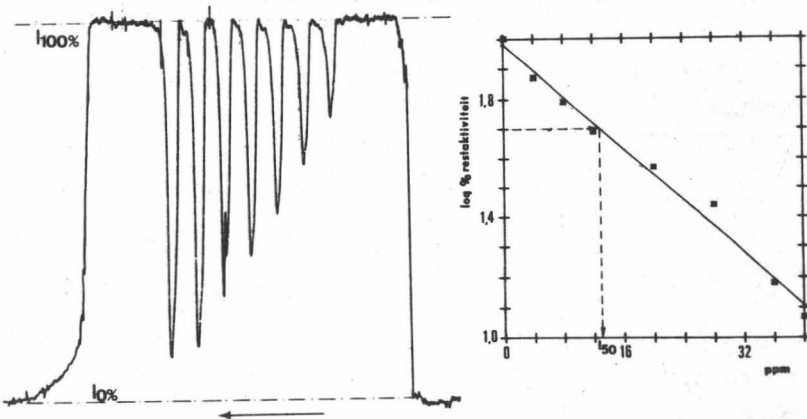
De bijzonderste leidingen zijn :

- I. Inhibitor
- I'. Broomwater
- II. Enzymepreparaat
- III. Lucht
- IV. ASCh/DTNB
- V. Buffer
- VI. Water

Figuur 20 : Flow-diagram van automatische I_{50} -bepaling.



Figuur 21 : Inhibitieverloop bij de geautomatiseerde Ellman-methode en de grafische I_{50} -bepaling.



De organofosforverbinding wordt eerst samen met het enzyme gecubeerd gedurende een bepaalde tijd (9') waarbij een deel van het enzyme geïnhibeerd wordt. Vervolgens wordt ASCh toegevoegd samen met DTNB dat een kleur geeft, veroorzaakt door het niet-geïnhibeerde enzyme (rest-aktiviteit). De grafieken bekomen met dit automatisch systeem geven dus een reeks pieken waarvan de hoogte evenredig is met de hoeveelheid inhibitor. Voorafgaandelijk wordt de 0 % enzymaktiviteit (I_0) gemeten, d.i. de absorptie bekomen door alleen buffer en substraat (ASCh) door het systeem te pompen. Na vervanging van de bufferoplossing met enzyme-oplossing bekomt men een maximale kleurvorming bij 100 % enzyme-aktiviteit (I_{100}). Daarna worden verschillende concentraties inhibitor doorgepompt welke een verminderde kleurvorming (enzyme -aktiviteit) teweegbrengen. Een dergelijk verloop wordt afgebeeld in fig. 21. Deze absorptievermindering is groter naarmate de inhibitorconcentratie groter wordt en ze is ook afhankelijk van de inhibitiekracht van de organofosforverbinding zelf.

Het percent restaktiviteit wordt berekend als :

$$\% \text{ restaktiviteit} = 100 - \frac{\text{piekhoogte} \times 100}{\text{hoogteverschil } (I_{100} - I_0)} \quad (\text{vgl. 26})$$

De I_{50} -waarde wordt bepaald door deze restaktiviteit (log-waarde) uit te zetten t.o.v. de concentratie, zoals geïllustreerd in fig. 21. Met deze kurve kan de concentratie overeenkomstig 50 % restaktiviteit (I_{50}) afgelezen worden. Deze rechte kan ook berekend worden met de methode der kleinste kwadraten en hieruit kan de I_{50} -waarde berekend worden.

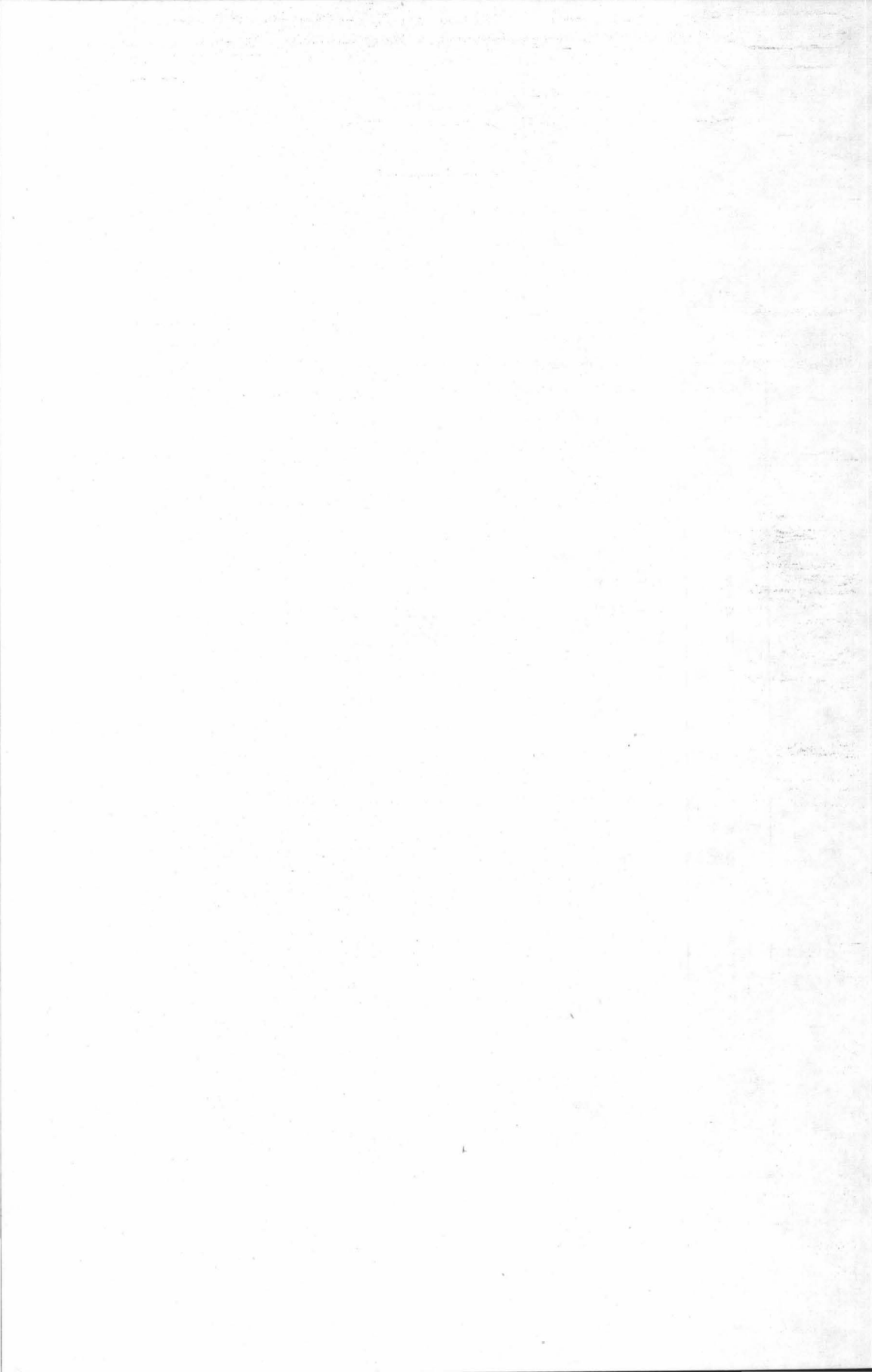
5. RESULTATEN EN BESPREKING

De resultaten zijn samengebracht in tabel 15. De in vitro-werking van de O-alkyl-O-aryl fenylfosfonaten varieert van zeer actief tot inactief. Duidelijk blijkt dat R^2 -substituenten zoals nitro- en cyanogroepen de werking verhogen, terwijl alkyl- en alkoxygroepen deze werking verlagen. De alkylgroep op de R^1 -substitutieplaats heeft slechts een geringe invloed. Ter informatie worden de I_{50} -waarden van enkele belangrijke insecticiden voor AChE uit vliegengoppen vermeld:

paraoxon	$2,6 \times 10^{-8}$
malaoxon	$2,6 \times 10^{-6}$
aldicarb	$8,4 \times 10^{-5}$

TABEL 15 : I_{50} en pI_{50} -waarden

Nr	Substituent	I_{50} (M)	pI_{50}
a	H	$> 1,0 \cdot 10^{-2}$	$< 2,000$
b	2 - CH_3	$> 1,0 \cdot 10^{-2}$	$< 2,000$
c	3 - CH_3	$> 1,0 \cdot 10^{-2}$	$< 2,000$
d	4 - CH_3	$3,1 \cdot 10^{-3}$	2,509
e	2 - OCH_3	$> 1,0 \cdot 10^{-2}$	$< 2,000$
f	3 - OCH_3	$> 1,0 \cdot 10^{-2}$	$< 2,000$
g	4 - OCH_3	$> 1,0 \cdot 10^{-2}$	$< 2,000$
h	2 - Cl	$2,7 \cdot 10^{-3}$	2,569
i	3 - Cl	$1,5 \cdot 10^{-4}$	3,824
j	4 - Cl	$2,2 \cdot 10^{-3}$	2,658
k	2 - CN	$6,6 \cdot 10^{-6}$	5,180
l	3 - CN	$1,1 \cdot 10^{-5}$	4,959
m	4 - CN	$1,4 \cdot 10^{-6}$	5,854
n	2 - NO_2	$7,6 \cdot 10^{-6}$	5,119
o	3 - NO_2	$7,2 \cdot 10^{-6}$	5,143
p	4 - NO_2	$1,8 \cdot 10^{-6}$	5,745
q	4 - F	$6,3 \cdot 10^{-3}$	2,201
r	4 - Br	$1,4 \cdot 10^{-3}$	2,854
s	4 - I	$7,0 \cdot 10^{-4}$	3,155
t	4 - C_2H_5	$1,5 \cdot 10^{-4}$	3,824
u	4 -n C_3H_7	$3,4 \cdot 10^{-3}$	2,469
v	2,4 - di Cl	$2,0 \cdot 10^{-5}$	4,699
w	2,3,4,5,6-penta Cl	$7,2 \cdot 10^{-4}$	3,143
x	2,5-di Cl-4-Br	$5,4 \cdot 10^{-6}$	5,268
y	4-CN ($\text{R}^1 = \text{CH}_3$)	$1,7 \cdot 10^{-6}$	5,824
z	4-CN ($\text{R}^1 = \text{C}_3\text{H}_7$)	$4,9 \cdot 10^{-6}$	5,310



HOOFDSTUK V : BIOLOGISCHE EIGENSCHAPPEN VAN O-ALKYL-O-ARYL =====

FENYLFOSFONOTHIOATEN =====

1. DEFINITIE VAN LD₅₀-WAARDE

De biologische aktiviteit *in vivo* van insekticiden is in feite het enige wat van praktisch belang is, doch een juiste schatting ervan heeft steeds veel moeilijkheden veroorzaakt omdat de verandering van de biologische respons na toediening van het aktief produkt afhankelijk is van een ganse reeks factoren die soms moeilijk te benaderen en te reproduceren zijn. Het verband tussen de toegepaste dosis en de biologische reactie is steeds een twistpunt geweest omdat, wegens de complexiteit van de beïnvloede factoren, de resultaten dikwijls onbetrouwbaar waren.

Bij het bepalen van de procentuele reactie na toediening van een bepaalde dosis wordt gewoonlijk de kumulatieve reactie uitgezet t.o.v. de dosis. Rekenkundig uitzetten geeft een asymmetrische kurve zoals in fig. 22a, doch bij logaritmisch uitzetten van de dosis heeft de kurve een symmetrische sigmoïde vorm met een bijna lineair centraal gedeelte (fig. 22b) (75).

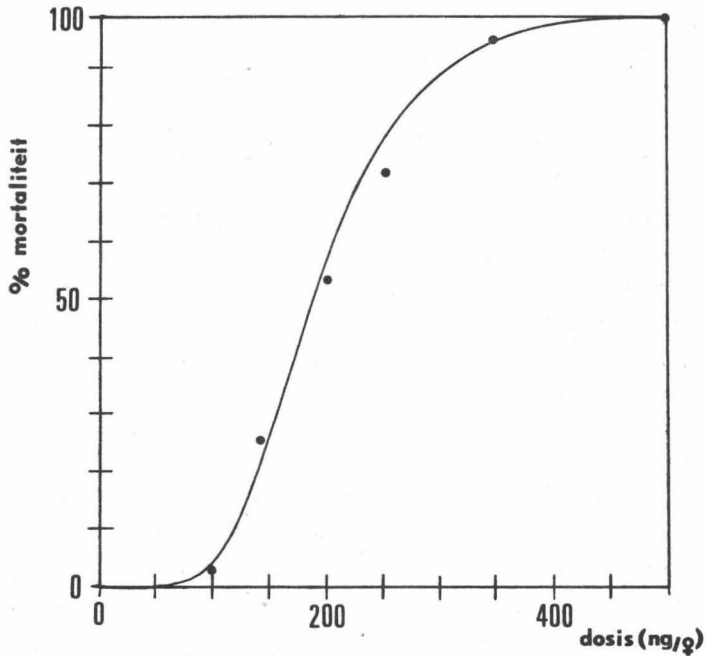
De dosis waarbij de helft van de populatie de respons-eigenschap vertoont valt juist in het midden van dit quasi-lineair gebied en is de ED₅₀ (effectieve dosis). Indien sterfte als respons beschouwd wordt bekomt men de LD₅₀-waarde (lethale dosis). ED₅₀ en/of LD₅₀-waarden worden meestal uitgedrukt in mg/kg levend gewicht of in µg of vg/testdier.

LD₅₀-waarden worden algemeen aanvaard als de beste waarden om de acute toxiciteit van een produkt te omschrijven. Om reproduceerbare waarden te bekomen tracht men de omstandigheden zoveel mogelijk te standardiseren. LD₅₀-waarden variëren sterk van soort tot soort en met de experimentele omstandigheden. Toedieningswijze, geslacht, ouderdom, gewicht, voedingssamenstelling, concentratie en oplossingsmiddel van het testprodukt moeten daarom gespecificeerd en gestandaardiseerd zijn.

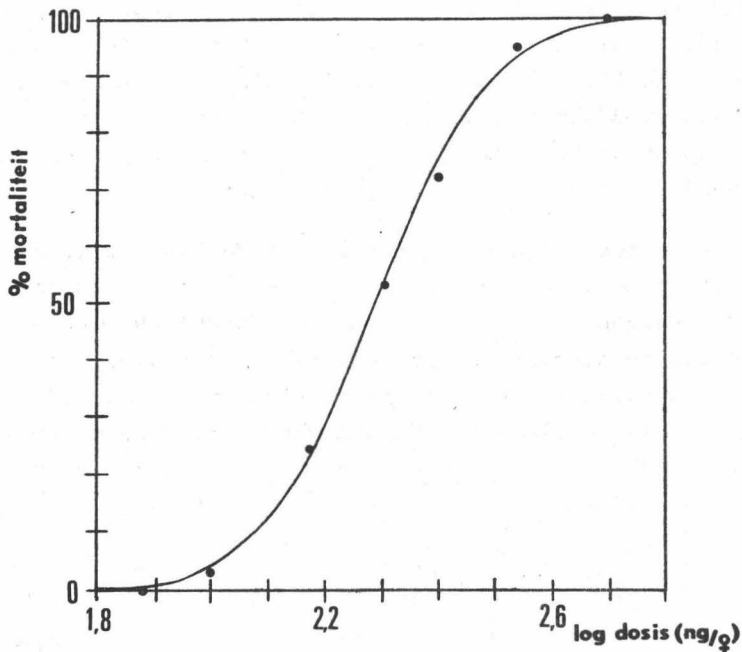
Toch biedt de LD₅₀-waarde bepaalde nadelen. Het is immers mogelijk dat de helling van het lineair deel der kurve verschillend

Figuur 22 : Dosis-respons kurven bij de bepaling van de LD_{50} -waarde van 41 na topische toepassing op Musca domestica.

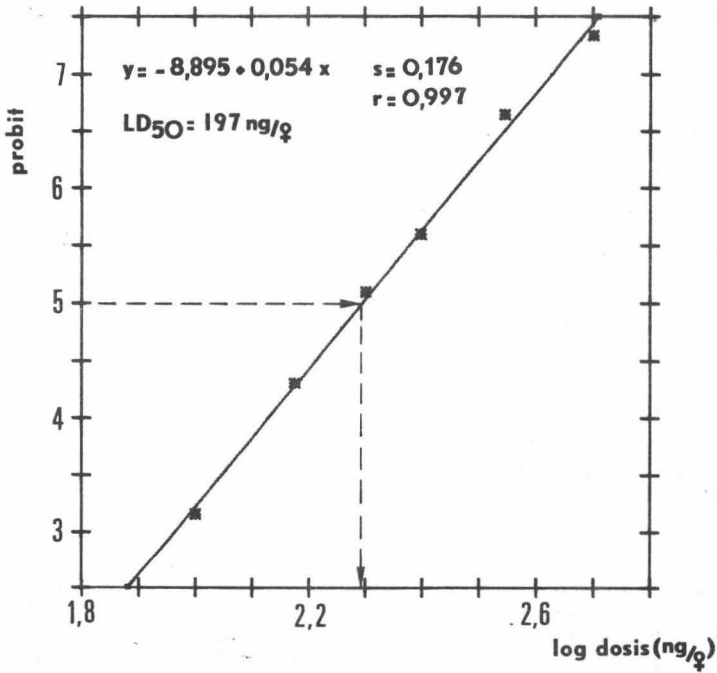
a : % doding en concentratie in lineaire schaal.



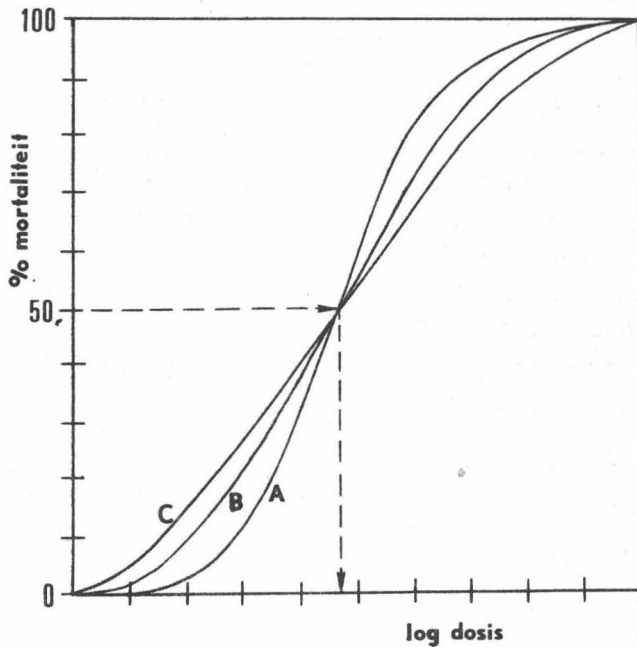
b : concentratie in logaritmische schaal.



c : % doding in probit schaal.



Figuur 23 : Dosis-respons kurven met eenzelfde LD₅₀-waarde doch met verschillende helling.



is van helling en toch gelijke LD_{50} -waarden geeft zoals in fig. 23. Dit heeft voor gevolg dat, in geval van een steile helling, een kleine dosisverandering een groot verschil in sterfte teweegbrengt (curve A), terwijl een niet steile helling veel minder verandering van de sterfte teweegbrengt (curve C). De LD_{50} -waarde levert geen informatie omtrent de subacute en chronische toxiciteit, evenmin over de symptomen en hun snelheid van optreden bij intoxicatie.

2. METHODE VOOR DE BEPALING VAN LD_{50} -WAARDEN

Er zijn verschillende manieren om een insecticide toe te dienen aan een testdier. De meest gebruikte methode is de topische toepassing, waarbij het insecticide, opgelost in een niet toxisch en vluchtig oplosmiddel, in contact gebracht wordt met een bepaalde plaats van het lichaamsoppervlak. Meestal worden combinaties van een konstante hoeveelheid oplosmiddel met verschillende concentraties insecticide gebruikt om alzo het contactoppervlak en de invloed van het solvent konstant te houden. Alhoewel de resultaten, bekomen met topische toepassingen, zeer reproduceerbaar zijn en een goede relatieve waarde geven voor de contactwerking van een insecticide geeft de methode onvoldoende informatie over de werkelijke hoeveelheid die in het insectenlichaam is doorgedrongen. Indien een exacte kennis van deze hoeveelheid nodig is moet de injectiemethode aangewend worden. Bij deze tijdrovende techniek wordt het insecticide opgelost in een draagstof zoals propyleenglycol of plantaardige olie en vervolgens intraperitoneaal geïnjecteerd. Aangezien het in deze studie echter van minder belang is om de exacte hoeveelheid te weten die nodig is om in het lichaam een standaardresponsie te geven, en de penetratie uit te schakelen, doch integendeel, het de bedoeling is deze penetratie als onderdeel van de aktiviteit te bestuderen is de topische toepassing de meest geschikte methode.

Wijfjes van de huisvlieg (*Musca domestica*) van de SSR-stam worden gekweekt onder gestandaardiseerde omstandigheden en na 3-4 dagen behandeld met verschillende concentraties van het pesticide door topische toepassing op de thorax. Na 24 uur wordt het aantal doden geteld.

Er zijn verschillende manieren om de bekomen mortaliteiten te verwerken. De eenvoudigste bestaat erin het mortaliteitspercentage uit te zetten t.o.v. de dosis en de log dosis-mortaliteitskurve te tekenen op zicht zoals in fig. 22b. Biologische gegevens zijn dikwijls echter te onnauwkeurig om een perfekt passende kurve te trekken op zicht zodat een mathematische transformatie tot een lineaire kurve noodzakelijk is. Door deze methode wordt de mortaliteit omgezet tot probits (probability units). Een grondige studie van de theorie en het gebruik van probit analyse werd uitgewerkt door Finney (76). Het mortaliteitspercentage (gecorrigeerd met de blanco-mortaliteit) wordt hier omgezet tot probits en geeft bij uitzetten t.o.v. de log dosis-waarde een rechtlijnig verloop zoals geïllustreerd in fig. 22c.

Door Finney (76) werd een statistische methode uitgewerkt om een nog meer exacte verwerking van de gegevens te bekomen. Een computerprogramma werd opgesteld om deze berekeningen te maken.

3. RESULTATEN EN BESPREKING

De LD_{50} -waarden (resp. in $\mu g/g$ vlieg en in $\mu g/g$ vliegen) en de $\log 1/LC_{50}$ (in mol/g vliegen) zijn samengebracht in tabel 16 en een typische probit - log dosis kurve is afgebeeld in fig. 22c voor het m-cyanoderivaat 41.

Ingedeeld in grote categorieën bekomt men volgende klassificatie :

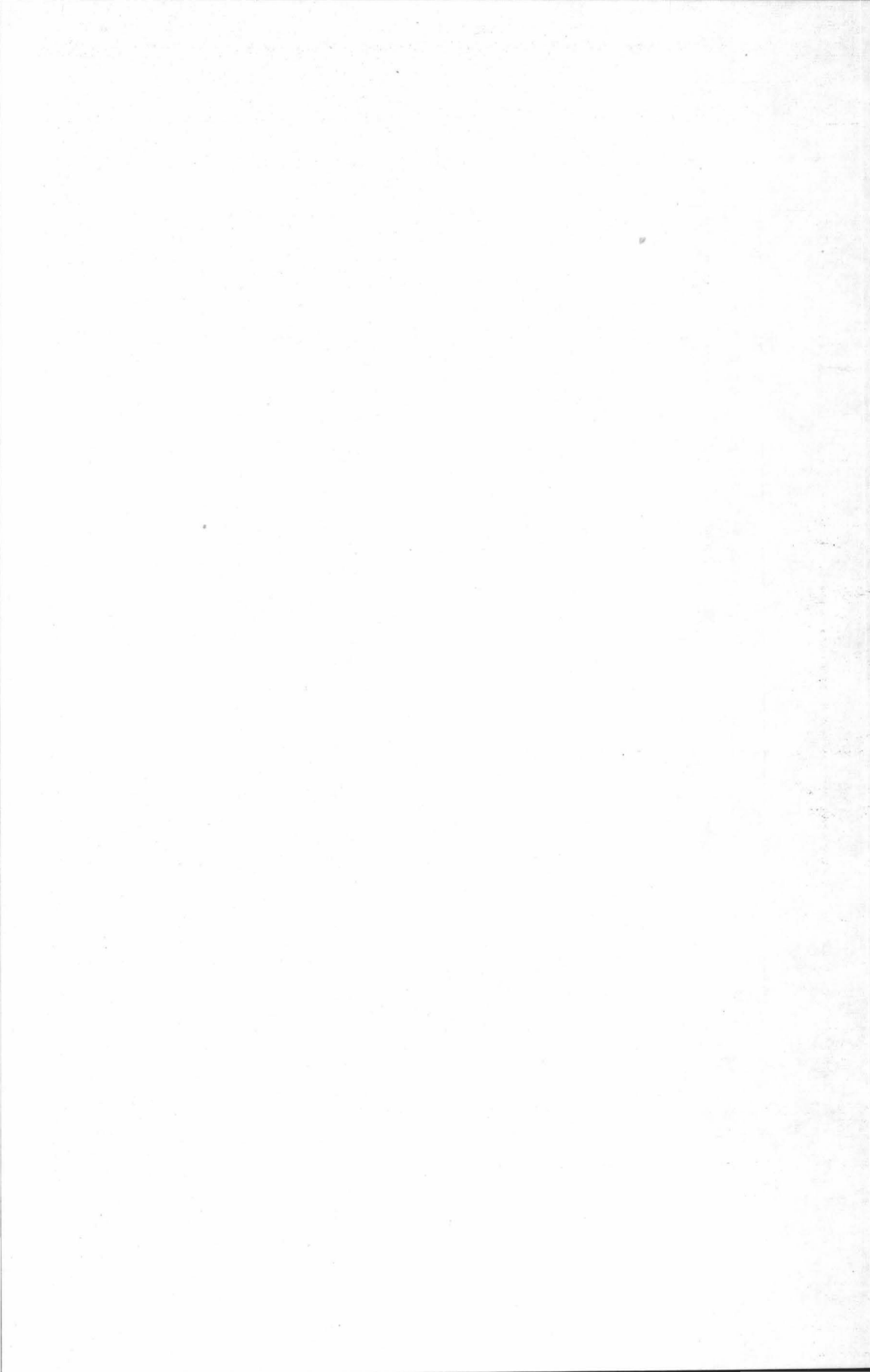
- > 800 $\mu g/g$: -H, 2- CH_3 , 3- CH_3 , 2- OCH_3 , 3- OCH_3 , 4- OCH_3 , 4-F
- 400 - 800 : 4- CH_3 , 2-Cl, 4- nC_3H_7
- 40 - 400 : 4-Cl, 4-Br, 4-I, 4- C_2H_5 , 2,3,4,5,6-penta Cl
- 8 - 40 : 2,4-diCl, 4-CN ($R^1 = C_3H_7$)
- 4 - 8 : 2-CN, 3-CN, 2- NO_2 , 3- NO_2 , 2,5-diCl - 4-Br, 2,5-diCl - 4-Br (oxon)
- < 4 : 4-CN, 4- NO_2 , 4-CN ($R^1 = CH_3$)

Ter informatie worden de LD_{50} ($\mu g/g$) gegeven voor enkele klassieke insecticiden :

	huisvlieg (♀)	rat
parathion	1,2	5
DDT	170,0	113
aldrin		67
aldicarb	5,5	1
pyrethrum	15	580
<u>4p</u>	1,4	40

TABEL 16 : LD₅₀-waarden

Nr	Substituent	LD ₅₀ (vg/ vlieg)	LD ₅₀ (µg/g vlieg)	log (1/ LC ₅₀)
a	H	> 40.000	> 1600,0	< 3,700
b	2 - CH ₃	> 40.000	> 1600,0	< 3,700
c	3 - CH ₃	> 40.000	> 1600,0	< 3,700
d	4 - CH ₃	11.243	449,7	4,415
e	2 - OCH ₃	37.121	1484,8	3,919
f	3 - OCH ₃	> 40.000	> 1600,0	< 3,700
g	4 - OCH ₃	> 40.000	> 1600,0	< 3,700
h	2 - Cl	12.250	490,0	4,407
i	3 - Cl	1.216	48,6	5,410
j	4 - Cl	8.701	348,0	4,555
k	2 - CN	126,0	5,0	6,381
l	3 - CN	196,2	784,8	6,189
m	4 - CN	43,0	1,7	6,848
n	2 - NO ₂	146,1	5,8	6,345
o	3 - NO ₂	114,4	4,6	6,350
p	4 - NO ₂	35,5	1,4	6,956
q	4 - F	21.313	852,5	4,143
r	4 - Br	7.200	288,0	4,695
s	4 - I	4.266	170,6	4,862
t	4 - C ₂ H ₅	1.630	65,2	5,271
u	4 - nC ₃ H ₇	12.505	500,2	4,403
v	2,4-di-Cl	323,2	12,9	6,031
w	2,3,4,5,6-penta Cl	6.278	251,1	4,831
x	2,5-di Cl-4-Br	157,2	6,3	6,433
y	4-CN (R ¹ =OCH ₃)	42,3	1,7	6,835
z	4-CN (R ¹ =OC ₃ H ₇)	827,6	33,1	6,465
4'	2,5-di Cl-4-Br(oxon)	123,6	4,9	6,514



DEEL II : VERBAND TUSSEN DE CHEMISCHE STRUKTUUR EN DE BIOLOGISCHE AKTIVITEIT VAN O-ALKYL-O-ARYL FENYL-FOSFONOTHIOATEN

Jaarlijks verschijnen in de literatuur een steeds groeiend aantal publikaties handelend over de toepassing van kwantitatieve structuur-aktiviteitsrelaties (SAR's) die de factoren bestuderen die de biologische aktiviteit van gesynthetiseerde scheikundige verbindingen bepalen (geneesmiddelen, pesticiden, cosmetica, edm...). De explosieve ontwikkeling van deze discipline wordt geïllustreerd door het aantal publikaties handelend over de Hansch-methode (zie verder) : in 1962/63 2, in 1968/69 reeds meer dan 45 en sinds 1970 verschijnen jaarlijks honderden Hansch-analysen (77).

Drie belangrijke SAR-technieken kunnen onderscheiden worden

- Het lineaire vrije-energie model (Hansch)
- Het mathematisch model (Free-Wilson)
- Het quantum-chemisch model.

In de lineaire vrije-energie benadering, ontwikkeld door Hansch en medewerkers (78), wordt de biologische aktiviteit beschouwd als de resultante van fysicochemische factoren (hydrofiele, elektrofiele en sterische) die kunnen uitgedrukt worden als vrije-energie parameters :

$$\text{biologische aktiviteit} = f(\text{fysicochemische parameters}) \text{ (vgl. 27)}$$

In de mathematische modellen wordt uitgegaan van de hypothese dat de biologische aktiviteit additief is voor elke substituent, zodanig dat ze kan voorgesteld worden als de som van de biologische aktiviteit van een basisstructuur (μ) en de aktiviteitsbijdragen van de verschillende substituenten (a):

$$\text{biologische aktiviteit} = \mu + \sum a \quad \text{(vgl. 23)}$$

Het quantum-chemisch model is gebaseerd op de oplossing van de Schroedinger-vergelijking van moleculaire systemen, waarbij alle fysische en chemische moleculaire eigenschappen herleid worden tot hun elektronische oorsprong in de molekule.

Deze methoden verschillen onderling in de mate van theoretische sofisticatie die nodig is om een bruikbare werkingsvergelijking te bekomen doch ze zijn alle sterk afhankelijk van multiple regressietechnieken om uiteindelijk de waargenomen biologische activiteit in verband te brengen met het gegeven model.

De bedoeling van de SAR's bestaat er niet alleen in biologische gegevens met fysicochemische of statistische konstanten te correleren of het a priori bepalen van de biologische activiteit die zou moeten waargenomen worden voor een bepaalde verbinding, doch vooral in het bestuderen hoe de moleculaire eigenschappen moeten beïnvloed worden om tot een betere biologische activiteit te komen en hoe deze invloed in verband staat met het vooropgesteld mathematisch, fysisch of chemisch model. Zo kan een wiskundig uitgedrukte relatie, gebaseerd op fysicochemische factoren, op een kwantitatieve manier de rationele gevolgtrekkingen, die slechts kwalitatief zijn, vervangen. Indien de werkingshypothesen juist blijken te zijn dan kunnen deze SAR's tevens bijkomende informatie en indicaties geven om andere analoge produkten of andere biologische systemen verder uit te testen.

Bij het onderzoek naar nieuwe biologisch actieve verbindingen kunnen drie belangrijke procedures gevolgd worden :

1. Routine screening, waarbij gesynthetiseerde chemicaliën van allerlei aard lukraak onderzocht worden op hun werking tegen een reeks schadelijke organismen.
2. Structuurveranderingen aangebracht op verbindingen met gekende biologische activiteit.
3. Biochemische design, waarbij nieuwe verbindingen, die op een gelijkaardige wijze zouden kunnen werken als bekende biochemische bestanddelen, uitgetest worden.

Het is vooral bij deze laatste procedure dat de SAR's zeer nuttige informatie kunnen opleveren.

HOOFDSTUK I : HET LINEAIRE VRIJE-ENERGIE MODEL (HANSCH METHO- =====

DE)

==

1. OPSTELLEN VAN HET VRIJE-ENERGIE MODEL

a. Principe

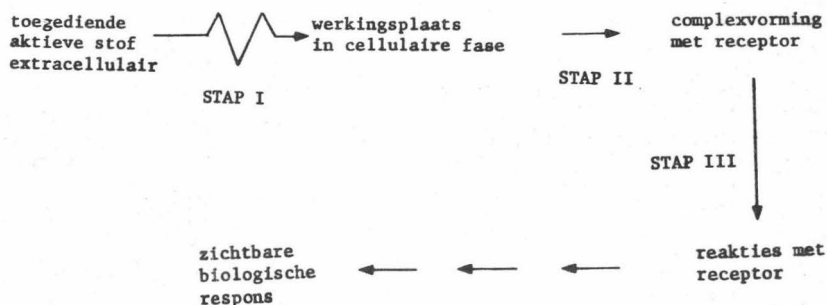
De biologische aktiviteit van een produkt is het waarneembaar resultaat van een ganse reeks invloeden welke de molekulen ondergaan bij de opname, het transport tussen toedieningsplaats en werkingsplaats, en de reaktie met de receptor. Hansch, en vele onderzoekers na hem, stelden modellen op om te komen tot een kwantitatieve verklaring van deze biologische aktiviteit, die echter nog veel veronderstellingen en hypothesen inhouden.

In principe is het model opgebouwd in drie trappen (79) :

1. De aktieve stof, uitwendig toegediend, bereikt de onmiddellijke omgeving van de receptorplaats door een passief transport door celmembranen en lichaamsvloeistoffen.
2. De vorming van een complex tussen receptor en aktieve stof.
3. Dit complex ondergaat bepaalde chemische reakties die leiden tot een biologische responsie.

Deze drie trappen worden geïllustreerd in fig. 24 :

Figuur 24 : Schematische voorstelling van de biologische aktiviteit.



De kans (P) dat een actieve molekule deze drie stappen doorloopt is het produkt van de kansen der individuele trappen (I, II en III) :

$$P = P_1 \cdot P_2 \cdot P_3 \quad (\text{vgl. 29})$$

Deze drie trappen kunnen veel verschillen in belangrijkheid van het ene geval naar het andere. Zo kan een bepaalde stap geen effectieve barrière zijn en is de probaliteit van deze stap één of in ieder geval zodanig groot dat deze stap geen invloed heeft op de eindprobabiliteit. Bij in vitro-proeven op geïsoleerde enzymepreparaten is P_1 uiteraard uitgesloten. In sommige gevallen is competitieve complexvorming alleen reeds voldoende, zodat P_3 verwaarloosbaar is omdat het helemaal geen invloed meer heeft op de biologische responsie.

Het aantal molekulen (N) dat in een bepaalde tijd de drie trappen doorloopt wordt gegeven door de vergelijking :

$$N = N_0 \cdot P = k \cdot C_0 \cdot P_1 \cdot P_2 \cdot P_3 \quad (\text{vgl. 30})$$

N_0 en C_0 zijn resp. het aantal molekulen en de molaire concentratie van de toegepaste actieve stof, k is een konstante.

Er bestaat dus een verband tussen de molekulen die de derde stap voleindigen en de biologische responsie want N is in vgl. 30 equivalent met het aantal geblokkeerde receptorplaatsen. De meest aangewende methode om een biologische responsie uit te drukken op moleculaire basis is de bepaling van de concentratie nodig om een standaardresponsie te veroorzaken zoals de concentratie voor 50 % doding (LC_{50}) of de concentratie voor 50 % enzyme-inhibitie (I_{50}). In deze gevallen wordt verondersteld dat een equivalent aantal receptorplaatsen wordt geblokkeerd (alhoewel de mogelijkheid dat een groter deel van de receptoren minder effectief worden geblokkeerd, en zo dezelfde responsie geven, niet helemaal werden uitgesloten) en zijn waarden als LD_{50} (uitgedrukt in mg/kg) niet bruikbaar, doch wel hun molaire equivalenten (LC_{50} : mol/kg levend gewicht).

Vgl. 30 kan herschreven worden als :

$$\frac{1}{C_0} = \frac{k}{N} \cdot P_1 \cdot P_2 \cdot P_3 \quad (\text{vgl. 31})$$

$$\text{of} \quad \frac{1}{C_0} = k' \cdot P_1 \cdot P_2 \cdot P_3 \quad (\text{vgl. 32})$$

$$\text{of} \quad \log (1/C_0) = \log P_1 + \log P_2 + \log P_3 + k'' \quad (\text{vgl. 33})$$

Het probleem blijft nu nog waarden te vinden voor de drie probabiliteitstermen in vgl. 33, korresponderend met de drie trappen van het model. In de volgende drie sekties worden deze trappen nader besproken om het verband aan te tonen tussen de vrije energie van dit proces en de probabiliteit dat dit proces zal doorgaan. Alhoewel de veranderingen die optreden in elke stap gebaseerd zijn op veranderingen in vrije energie (ΔG), zal steeds getracht worden deze om te zetten in "extra-thermodynamische" of lineaire vrije energierelaties, uitgedrukt in $\Delta(\Delta G)$; d.w.z. veranderingen van ΔG waargenomen tussen de verschillende leden van een reeks actieve stoffen. Het komt er dus niet op aan ΔG of $\Delta(\Delta G)$ te berekenen, omdat men in feite niet geïnteresseerd is in absolute cijfers, doch alleen reeksen van relatieve waarden te bekomen die een verhouding weergeven van de vrije energieveranderingen onderling in een reeks actieve produkten. In deze "lineaire vrije energie relaties" wil men in een korrekte mathematische formule de veranderingen van $\Delta(\Delta G)$ vastleggen volgend uit het verschil in fysische eigenschappen tussen de molekulen van een reeks verwante actieve stoffen.

In een laatste sektie zullen dan de bekomen lineaire vrije energie parameters gesubstitueerd worden in vgl. 33 ten einde een bruikbare algemene vergelijking te bekomen voor structuur-aktiviteitsrelaties.

b. Transport van de actieve stof naar de werkingsplaats

De meeste molekulen worden in een levend organisme passief vervoerd doorheen celmembranen en in lichaamsvloeistoffen.

Ze worden "geëxtraheerd" door de vetbestanddelen aan de ene kant van een celmembraan en teruggeëxtraheerd door de waterige fase aan de andere zijde. Dit proces wordt herhaald voor elk membraan dat zich bevindt tussen de toedieningsplaats en de werkingsplaats. Het transport van een actieve molekule in een levend organisme is geen gerichte beweging doch gewoon een "random walk"-beweging die volledig aan het toeval overgelaten wordt en alleen gericht wordt door irreversiebele en zeer effectieve membranen.

Van belang is dus het vermogen van een molekule om in een lipiede, hydrofobe fase opgenomen te worden. Hydrofobe eigenschappen van een reeks analoge verbindingen kunnen vergeleken worden door de π -waarde (31), een extra-thermodynamische konstante die een maat is voor de vrije energie van de overdracht van substituenten van een waterige naar een lipofiele fase. Deze π -waarde is de logaritme van de verhouding der verdelingscoëfficiënten (k/l) van het gesubstitueerde (X) en het niet-gesubstitueerde (H) lid van een analoge reeks produkten (vgl. 6).

Hansch en Fujita (79) suggereerden dat de probabilliteit dat een molekule door een celmembraan kan dringen door passief transport een parabolische funktie van π is. Er kan een optimale waarde van π worden verondersteld (80), niet te hydrofiel om absorptie aan de membranen te bekomen en niet te lypofiel om verder transport mogelijk te maken. Mc Farland (81) toonde aan dat dit verband niet strikt parabolisch is doch praktisch als zodanig kan beschouwd worden. Hij berekende de probabilliteit (P) van een molekule om een model van n afwisselende waterige en lipiede membranen in een hypothetisch biologisch systeem te doorlopen als:

$$\log P = n \left[\log \sqrt{k/l} - \log (k/l + 1) \right] \quad (\text{vgl. 34})$$

Deze kurve is erg gelijkend op een parabool want correlatie van deze funktie met de best passende parabool geeft een correlatiecoëfficiënt van 0.985. Slechts 3 % van de variatie blijft onverklaard zodat in de meeste praktische gevallen het para-

bolisch verband kan aanvaard worden.

De kans dat een actieve molekulē de receptorplaats bereikt kan best weergegeven worden met een parabool-gelijkende functie van hydrofobiciteit.

$$\log P_1 \sim a\pi^2 + b\pi + g \quad (\text{vgl. 35})$$

Dikwijls komt het echter voor dat men met een reeks verbindingen in een quasi-rechtlijnig gebied van de parabool werkt zodat de tweede machtsterm in vgl. 35 wegvalt.

c. Komplexvorming van de actieve stof met de receptor

Een molekulē in de direkte omgeving van een receptorplaats kan een complexvorming aangaan die beantwoordt aan de evenwichtsreactie :



M : actieve molekulē

R : receptor

MR : complex

met als evenwichtskonstante :

$$K = \frac{[MR]}{[M] \cdot [R]} \quad (\text{vgl. 36})$$

De probabiliteit dat een molekulē komplexeert met de receptor is gelijk aan de verhouding van de gekomplexeerde - tot het totaal aantal aanwezige molekulen

$$P_2 = \frac{[MR]}{[M] + [MR]} \quad (\text{vgl. 37})$$

Delen van teller en noemer door [M] en invoeren van K leidt tot :

$$P_2 = \frac{K [R]}{K [R] + 1} \quad (\text{vgl. 38})$$

Als $K[R] \gg 1$ dan wordt $P_2 \sim 1$, zodat een molekulē met grote

receptoraffiniteit in aanwezigheid van een groot aantal receptoren als complex zal teruggevonden worden; deze stap heeft dus geen inbreng in de totaalprobabiliteit, aangezien $\log P_2$ tot nul nadert.

Als $K[R]$ zeer klein wordt, herleidt vgl. 38 zich tot $P_2 = K[R]$ (vgl. 39). Dit geval komt veel voor wegens het gering aantal beschikbare receptorplaatsen in het systeem zodat $[R]$ zeer klein is ($\pm 10^{-8}$ mol/kg) (82).

Meestal herleidt P_2 zich tot vgl. 39 die kan uitgedrukt worden als :

$$\log P_2 = \log K + \log [R] \quad (\text{vgl. 40})$$

Daar $\log [R]$ konstant is voor een gegeven biologisch systeem krijgt men :

$$\log P_2 = \log K + g \quad (\text{vgl. 41})$$

Blijft nog het vinden van een parameter die toelaat $\log K$ te schatten.

Een eerste benadering bestaat erin $\log K$ te vergelijken met ΔG , de verandering in vrije energie bij de MR-komplexvorming. ΔG zou beschouwd kunnen worden als de som van alle krachten die tussenkomen bij deze komplexering. Deze omvatten hoofdzakelijk hydrofobe krachten, Van der Waals interacties en sterische factoren die beïnvloed worden door de ruimtelijke vorm van de molekule. Deze laatste zijn eerder intramolekulaair, terwijl de eerste twee intermolekulaair van aard zijn.

Hydrofobe binding kan terug bepaald worden door de π -konstante. Hansch (83) toonde aan dat $\Delta(\Delta G)$ hydrofoob $\sim \pi$. De Van der Waals interacties zijn van drieërlei oorsprong (84).

1. dipool-dipool of Keesom interacties :

$$E = - \frac{2 \mu_M^2 \mu_R^2}{3 r^6 k T}$$

2. dipool - geïnduceerde dipool of Debye interacties :

$$E = - \frac{\mu_M^2 \alpha_R}{r^6} = - \frac{\mu_R^2 \alpha_M}{r^6}$$

3. geïnduceerde dipool - geïnduceerde dipool of London interacties :

$$E = - \frac{3\alpha_M \alpha_R}{4r^6} \cdot \frac{I_M I_R}{I_M + I_R}$$

μ , α en I zijn resp. groepdipoolmoment, polariseerbaarheid en ionisatiepotentiaal van de substituent op de actieve molekule (M) of van de nabije groep op de receptor (R); r is de afstand tussen de twee dipolen, k de Boltzmann-konstante en T de absolute temperatuur. In identieke testomstandigheden op een analoge reeks produkten variëren alleen μ_M^2 en α_M onder de invloed van de verschillende substituenten, zodat ΔE funktie is van deze twee waarden :

$$\Delta E \sim m \mu^2 + n (\alpha_X - \alpha_H), \quad (\text{vgl. 42})$$

X duidend op de substituent van een lid van een analoge reeks molekulen en H op de ongesubstitueerde molekule.

Om de sterische invloeden van sommige substituenten op de complexvorming te omschrijven kan de E_s -konstante van Taft (85) aangewend worden. Onlangs suggereerde Hansch (86) de molaire refractie (M.R.) als een waarde voor de algemene "sterische" omvang van de substituent.

Samenbrengen van de krachten die tussenkomen bij de complexering geeft :

$$\log P_2 = b\pi + dE_s + e \mu_X^2 + f (\alpha_X - \alpha_H) + g \quad (\text{vgl. 43})$$

d. Reactie tussen receptor en actieve molekule in het complex

De actieve molekule en de receptor reageren met elkaar na de

komplexvorming volgens het reaktietype :



MR : complex tussen actieve molekulen en receptor

MR^{*} : transitietoestand van de reactie.

De eerste stap is een evenwichtsreactie met als evenwichtskonstante :

$$K' = \frac{[\text{MR}^*]}{[\text{MR}]} \quad (\text{vgl. 44})$$

De probabilliteit dat de reagerende molekulen die transitietoestand bereiken wordt gegeven door :

$$P_3 = \frac{[\text{MR}^*]}{[\text{MR}^*] + [\text{MR}]} \quad (\text{vgl. 45})$$

Na delen door [MR] en invoeren van K' bekomt men analoog met P₂ :

$$P_3 = \frac{K'}{K' + 1} \quad (\text{vgl. 46})$$

- Als K' >> 1 dan nadert P₃ één en log P₃ nul zodat de inbreng in de totale probabilliteit miniem is. Dit is het geval als de reactie zeer snel verloopt.
- Als K' klein wordt, herleidt vgl. 46 zich tot :

$$\log P_3 \sim \log K' \quad (\text{vgl. 47})$$

Alhoewel de evenwichtskonstante K' in het MR-complex in vivo onbekend is, kan wel aangenomen worden dat ze analoog is met de evenwichtskonstante van chemische reacties die in het laboratorium wel te bepalen zijn . Doch veel handiger is gebruik te maken van de "extrathermodynamische" benadering voorgesteld door Hammett (87) :

$$\log \left(\frac{k_X}{k_H} \right) = \rho \sigma \quad (\text{vgl. 48})$$

met k : evenwichtskonstante van resp. een gesubstitueerd (X) en het niet-gesubstitueerde (H) analoog

ρ : konstante die varieert van reactie tot reactie

σ : substituent-konstante variërend volgens substituent doch niet volgens de reactie.

Naast σ zijn daarna nog veel elektronische substituent-konstanten beschreven.

In sommige gevallen zijn elektronische parameters alléén niet voldoende om de reactie volledig te omschrijven wegens mogelijke sterische invloeden. Deze sterische factoren kunnen dan eveneens ingelast worden in deze reactie zodat :

$$\log P_3 = c\sigma + dE_S + g.$$

e. De multiparameter vergelijking

Samenvoeging van de bekomen parameters die een rol spelen in de drie trappen leidt tot volgende algemene vergelijking :

$$\log (1/C_X) = a\pi_X^2 + b\pi_X + c\sigma_X + dE_{S_X} + e\mu_X^2 + f\Delta\alpha_X + g$$

(vgl. 49)

Het is duidelijk dat niet alle parameters even belangrijk zijn; bovendien varieert de inbreng van elke parameter van geval tot geval. Uit experimentele gegevens is gebleken dat termen in μ en α slechts uitzonderlijk een rol spelen (88, 89) zodat de bijzonderste invloeden van driërlei aard zijn : hydrofoob, elektronisch en sterisch. Aan de hand van de statistische verwerking door multiple regressie-analyse kan men uitmaken welke parameters al of niet in aanmerking moeten genomen worden. Bovendien kunnen deze parameters vervangen worden door analoge of experimenteel bepaalde parameters die specifiek of nauwkeuriger zijn voor een bepaald geval.

2. DE LINEAIRE VRIJE ENERGIE-PARAMETERS

a. Elektronische parameters

Elektronische parameters gebaseerd op lineaire vrije energie-

relaties zijn reeds lang gekend in de fysische organische scheikunde. Hammett (87) toonde aan dat de chemische reaktiviteit van gesubstitueerde benzoëzuren kon gecorreleerd worden door volgende vgl. :

$$\log \frac{K_X}{K_H} = \rho \sigma_X \quad (\text{vgl. 48})$$

met K_H en K_X de reaktiekonstante van resp. de ongesubstitueerde en gesubstitueerde molekulen van een analoge reeks. De substituentkonstante σ_X geeft een waarde aan de elektronische inbreng van een substituent X en is toepasselijk op vele verschillende reacties, waarvan de snelheid afhangt van elektronen aantrekking of -afstoting van deze substituent. Deze konstante is onafhankelijk van de aard der reactie, dit in tegenstelling met ρ , de reaktiekonstante, die afhankelijk is van het reactietype. Gesubstitueerde benzoëzuren worden algemeen aanvaard als standaardreeks voor bepaling van σ -waarden, waarbij ρ wordt gelijkgesteld aan één en σ_H per definitie nul is.

Vgl. 48 kan getransformeerd worden in een andere vorm :

$$\log K_X = \rho \sigma_X + \log K_H \quad (\text{vgl. 50})$$

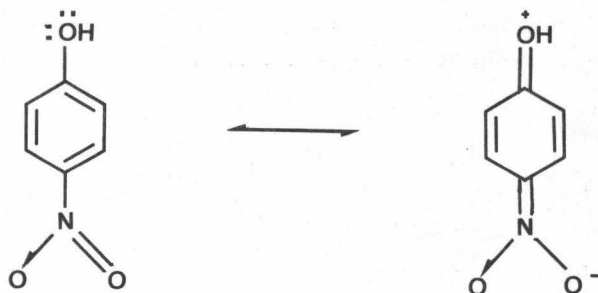
zodat uitzetten van het logaritme van een reaktiekonstante tegenover σ een rechte lijn geeft met ρ als helling en $\log K_H$ als snijpunt. De Hammett-vgl. 48 is toepasselijk op aromatische systemen en dan alleen nog voor reacties waarbij de substituent en het reactiecentrum goed geïsoleerd zijn van elkaar en geen andere invloeden ondergaan buiten de elektronische die veroorzaakt worden door verschuivingen van de aromatische π -elektronenwolk.

Er zijn een aantal beperkingen en nadelen in verband met de Hammett σ -konstanten :

- verschillende σ -waarden zijn nodig voor para- en meta-substitutie
- ze zijn niet bruikbaar voor ortho-substitutie
- de σ -waarden zijn geen echte konstanten daar ze enigszins variëren van systeem tot systeem (90), doch meestal zijn deze afwijkingen gering en daarenboven systematisch zodat ze

in de meeste gevallen toch goede resultaten geven.

In sommige gevallen, zoals in para-gesubstitueerde fenolen en aminen met bijvoorbeeld NO_2^- of CN -groepen voldoet de σ -konstante niet meer wegens het optreden van sterke resonantie-interakties, die het vrije elektronenpaar van de substituent delocaliseren :



Voor deze gevallen werd een speciale elektronische konstante, σ^- , berekend (91).

In een streven om steeds beter bepaalde reacties te verklaren werden tientallen vormen van elektronische substituent-konstanten van specifieke systemen ontworpen, zoals σ^{n} (90), σ^+ (92), σ^{O} (93), σ_{I} (93), σ_{R} (93), σ^{X} (85), $\sigma_{\text{O}}^{\text{X}}$ (85), σ' (94), E_{R} (95), enz...

Swain en Lupton (96) deden een interessante poging om in dit doolhof van elektronische parameters terug wat structuur te krijgen door ze te splitsen in inductieve (\mathcal{F})- en resonantie (\mathcal{R})- effecten. Ze toonden aan dat elke elektronische parameter voor te stellen is door :

$$\sigma = f\mathcal{F} + r\mathcal{R} \quad (\text{vgl. 51})$$

met \mathcal{F} en \mathcal{R} resp. inductie- en resonantiekonstanten verschillend volgens de substituent; f en r zijn empirische gewichtsfactoren die onafhankelijk zijn van de substituent zelf, maar verschillend voor elke reeks van substituentkonstanten.

Het is bekend dat de verschuiving van bepaalde stretching-vibraties in het I.R.-spektrum van een reeks analoge verbindingen toegeschreven kan worden aan de elektronische invloed van de

veranderende substituent.

Seth-Paul en Van Duyse (97) leidden uit de carbonyl stretching-vibraties van een reeks R'R''CO-verbindingen een elektronische substituentkonstante δ af die tevens het voordeel biedt toe-
passelijk te zijn op ortho-substituenten (wat niet het geval is voor de meeste σ -konstanten).

De bijzonderste elektronische parameters van de R²-substituenten zijn samengebracht in tabel 17.

TABEL 17 : Elektronische parameters

Substituent	σ	σ^-	δ	f	R
H	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
p - CH ₃	- 0,170	- 0,17	- 0,085	- 0,052	- 0,141
p - C ₂ H ₅	- 0,151	- 0,15	- 0,075	- 0,065	- 0,114
p - nC ₃ H ₇	- 0,126	- 0,13	- 0,060	- 0,075	- 0,095
p - OCH ₃	- 0,268	- 0,20	- 0,145	0,413	- 0,500
p - F	0,062	- 0,02	0,012	0,708	- 0,336
p - Cl	0,227	0,23	0,046	0,690	- 0,161
p - Br	0,232	0,23	0,046	0,727	- 0,176
p - I	0,280	0,28	0,055	0,672	- 0,197
p - CN	0,660	0,90	0,180	0,847	0,184
p - NO ₂	0,778	1,24	0,255	1,109	0,115
m - CH ₃	- 0,069		- 0,020		
m - OCH ₃	0,115		0,036		
m - Cl	0,373		0,112		
m - CN	0,560		0,184		
m - NO ₂	0,710		0,213		
o - CH ₃			- 0,110		
o - OCH ₃			- 0,190		
o - Cl			0,165		
o - CN			0,239		
o - NO ₂			0,400		

b. Hydrofobe parameters

Hydrofobe krachten zijn vooral het resultaat van een desolvatieproces te wijten aan de unieke eigenschappen van watermolekulen. Bij oplossing van een organische apolaire verbinding in water vormt zich een mantel van watermolekulen rond deze opgeloste molekulen. Dit gaat gepaard met een geringe warmteontwikkeling en een entropiedaling. Als dergelijk "complex" de waterfaze verlaat en overgaat naar een niet-polair solvent of een niet-polair deel van een eiwitmolekule wordt eerst deze organische molekule ontmanteld. De daarmee gepaard gaande entropiestijging noemt men de "hydrofobe binding".

Deze moeilijk definieerbare energie is praktisch onmogelijk te bepalen wegens haar complexiteit en men is aangewezen op een enigszins empirische benadering. Meyer (98) en Overton (99) toonden aan dat er een verband bestaat tussen sommige biologische processen en de wijze waarop de betrokken molekulen zich verdelen tussen natuurlijke oliën (zoals olijfolie) en water. Deze oliën werden gekozen wegens hun analogie met vetfazen in het organisme. In een latere studie vond men dat n-octanol en water even goed deze verdeling weergaven en het voordeel hebben stabiel en in meer gestandaardiseerde vorm aan te wenden zijn, en nu als algemeen erkend referentiesysteem zijn aanvaard (100).

De verdeling van een verbinding tussen twee fazen wordt uitgedrukt door de verdelingscoëfficiënt k/l . Hansch (78) toonde aan dat de verdelingscoëfficiënten van een groep organische verbindingen tussen twee verschillende lipofiele solventen (I en II) enerzijds en water anderzijds kunnen vergeleken worden door volgende vgl. :

$$(k/l)_I = a(k/l)_{II} + b \quad (\text{vgl. 52})$$

zodat in principe verdelingscoëfficiënten van het ene systeem kunnen omgerekend worden tot verdelingscoëfficiënten van een ander systeem.

Fujita (31) transformeerde deze verdelingscoëfficiënten tot een substituent-konstante, π , door, in analogie met de σ -konstante, de waarden te normeren ten opzichte van de ongesubstitueerde molekulen :

$$\pi = \log \frac{(k/l)_X}{(k/l)_H} \quad (\text{vgl. 6})$$

Een negatieve π -waarde wijst op een affiniteit voor de waterige, een positieve voor de lipiede fase. Daar k/l in verband staat met de vrije energie-verandering bij de overgang van een molekulen van water naar octanol, staat π in voor de vrije energie-verandering van de substituent.

Een zeer bruikbare en interessante eigenschap van π is zijn additiviteit (78), die het mogelijk maakt praktisch alle π -waarden te berekenen aan de hand van bestaande tabellen in de literatuur. Zo is, bij voorbeeld, de π -waarde van een 2,3,4-trichloro-gesubstitueerd derivaat de som der mono-gesubstitueerde derivaten die in tabellen gekend zijn. In tabel 18 zijn de π -waarden vermeld van de fosfonothioaten die onderzocht werden. Deze additiviteit is geen algemene regel, zodat er meestal voorzichtig mee omgesprongen wordt. Experimenteel bepaalde en berekende π -waarden kunnen soms verschillen wegens sterische en elektronische invloeden en het is steeds interessant bij een beperkt aantal verbindingen derte onderzoeken reeks de π -waarden experimenteel te bepalen (zoals in III .2.) en te toetsen aan de berekende waarden. Omdat het experimenteel bepalen van verdelingscoëfficiënten dikwijls praktische moeilijkheden biedt (zoals emulsievorming, kwantitatieve detectietechnieken, e.a.) werden andere experimentele technieken ontwikkeld om de verdeling tussen twee fasen te bepalen. ΔR_M -waarden (36) en π_{GLC} -waarden (44) kunnen eveneens een weergave zijn van de hydrofobe eigenschappen van een reeks molekulen.

c. Sterische parameters

Een van de moeilijkste problemen in het bestuderen van het verband tussen biologische activiteit en scheikundige structuur

TABEL 18 : Hydrofobe en sterische parameters

Substituent	$\pi_{\text{fenoxy-azijnzuur}}$	π_{benzeen}	E_s	M.R.
H	0,000	0,000	1,24	1,03
p - CH ₃	0,520	0,560	0,00	5,65
p - C ₂ H ₅	0,970	1,020	- 0,07	10,30
p - nC ₃ H ₇	1,400	1,550	- 0,36	14,96
p - OCH ₃	- 0,040	- 0,020	0,69	7,87
p - F	0,150	0,140	0,78	0,92
p - Cl	0,700	0,710	0,27	6,08
p - Br	1,020	0,860	0,08	8,88
p - I	1,260	1,120	- 0,16	13,94
p - CN	- 0,320	- 0,570	0,73	6,33
p - NO ₂	0,240	- 0,280	- 1,28	7,87
m - CH ₃	0,510			
m - OCH ₃	0,120			
m - Cl	0,760			
m - CN	- 0,300			
m - NO ₂	0,110			
o - CH ₃	0,680			
o - OCH ₃	- 0,330			
o - Cl	0,590			
o - CN	-			
o - NO ₂	- 0,230			

zijn de, soms zeer belangrijke, sterische invloeden die sommige substituenten hebben op de complexvorming tussen de actieve molekulen en de receptor. Zowel de ruimtelijke vorm van de receptorplaats als van de substituent op de actieve molekulen spelen hier een rol zodat het probleem tweevoudig is : intramolekulaire en intermolekulaire. De best gekende sterische substituentkonstanten zijn E_s en E_s^O van Taft (85), afgeleid van de

hydrolyse van resp. alifatische esters en van ortho-gesubstitueerde benzoëzuuresters. Deze konstanten gelden alleen voor intramoleculaire substituenteffekten, vooral in reakties waar de substituent dicht bij het reactiecentrum gelegen is. De intermoleculaire invloeden zijn zodanig specifiek dat ze voor elk geval apart moeten behandeld worden.

Charton (101) vond een lineaire verhouding tussen de E_S -konstante en de grootte van de substituent, uitgedrukt door de Van der Waalse atoom- of moleculaire radius van de substituent. E_S^O -konstanten voor ortho-substitutie op aromatische systemen vertoonden geen relatie met de grootte van de substituent doch konden grotendeels verklaard worden met elektronische invloeden, zodat het zgn. "ortho-effect" meer een elektronisch dan een sterisch verschijnsel is.

Hansch (86) suggereerde twee andere parameters voor de sterische invloed van substituenten : de molaire refraktie (M.R.) en het moleculair gewicht (M.W.). M.R. kan voor een vloeistof berekend worden met de Lorentz-Lorentz vergelijking en wordt uitgedrukt in volume-eenheden (cm^3/mol).

$$\text{M.R.} = \frac{\text{M.W.} (n^2 - 1)}{d (n^2 + 2)} \quad (\text{vgl. 53})$$

met M.W. : moleculair gewicht

n : refractieindex (20°C , na D-lijn)

d : densiteit (20°)

M.R. en M.W. geven een aanduiding van de "omvang" van een substituent, alhoewel M.R. ook elektronische invloeden bevat en men dus zeer voorzichtig dient om te springen met deze parameter. De sterische parameters voor de R^2 -substituenten zijn samengebracht in tabel 18.

Daar de ruimtelijke vorm van een aktieve molekule rechtstreeks afhangt van de energetisch meest voordelige configuratie van de molekule, ligt een mogelijke oplossing van het sterisch probleem op het terrein van de quantum-mechanische methode (zie hoofdstuk III).

3. MULTIPELE REGRESSIE-ANALYSE

Multipiele lineaire regressie-analyse is een techniek om een correlatie aan te tonen tussen twee of meerdere variabelen (102). Door de methode der kleinste kwadraten kan men de beste vergelijking zoeken tussen twee reeksen variabelen (X en Y) en men bekomt een vergelijking van de volgende vorm :

$$Y = b_0 + b_1X + b_2X^2 + \dots + b_nX^n + \epsilon \quad (\text{vgl. 54})$$

$b_0, b_1 \dots b_n$ zijn parameters en ϵ is de foutterm. De orde van de vergelijking (n) wordt bepaald door de hoogste exponent van de onafhankelijke veranderlijke X. Bij lineaire regressie is $n = 1$ en bekomt men een rechte $Y = b_0 + b_1X + \epsilon$. De "beste" rechte lijn is deze waarvan de som der kwadraten van de afstanden tussen de punten en deze lijn minimaal is. Stelt men \hat{Y} de berekende waarde van Y dan moet $SS = \sum (Y - \hat{Y})^2$ zo klein mogelijk zijn.

De parameters b_0 en b_1 kunnen dan berekend worden als volgt :

$$SS = \sum (Y_i - \hat{Y})^2 = \sum_{i=1}^n \epsilon_i^2 = \sum_{i=1}^n (Y_i - \beta_0 - \beta_1 X_i)^2 \quad (\text{vgl. 55})$$

met Y_i : elke waargenomen afhankelijke veranderlijke

ϵ_i : de afwijking van elk gegeven experimenteel punt tot de best passende rechte.

Wordt $b_0 + b_1X_i$ afgetrokken van de waargenomen waarde Y_i , dan bekomt men, na kwadrateren, de som der kwadraten (SS) :

$$SS = \sum_{i=1}^n (Y_i^2 - Y_i b_0 - Y_i b_1 X_i - b_0 Y_i + b_0^2 + b_0 b_1 X_i - b_1 X_i Y_i - b_0 b_1 X_i + b_1^2 X_i^2) \quad (\text{vgl. 56})$$

De partiële afgeleide van vgl. 56 resp. ten opzichte van b_0 en b_1 geeft :

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\delta SS}{\delta b_0} = \sum_{i=1}^n (Y_i - b_0 - b_1 X_i) \\ \frac{\delta SS}{\delta b_1} = \sum_{i=1}^n X_i (Y_i - b_0 - b_1 X_i) \end{array} \right. \quad (\text{vgl. 57})$$

Daar SS minimaal moet zijn worden vgl. (57) gelijkgesteld aan nul en kunnen herschreven worden als :

$$\left\{ \begin{array}{l} b_0 n + b_1 \sum_{i=1}^n X_i = \sum_{i=1}^n Y_i \end{array} \right. \quad (\text{vgl. 58})$$

$$\left\{ \begin{array}{l} b_0 \sum_{i=1}^n X_i + b_1 \sum_{i=1}^n X_i^2 = \sum_{i=1}^n X_i Y_i \end{array} \right. \quad (\text{vgl. 59})$$

Men bekomt een stelsel van twee vergelijkingen met twee onbekenden (b_0 en b_1), die kunnen berekend worden.

De standaardafwijking (s) van deze rechte wordt bekomen als volgt :

$$s = \sqrt{\frac{SS}{n - m}} \quad (\text{vgl. 60})$$

met n : aantal punten

m : aantal parameters

$n-m$: aantal vrijheidsgraden

Deze standaardafwijking is een zeer belangrijke waarde om de correlatie te beoordelen. Hoe kleiner s , hoe beter de punten de best passende rechte benaderen. In de praktijk echter kan s nooit kleiner zijn dan de standaardafwijking van de experimentele gegevens.

Een andere mogelijkheid om een correlatie te beoordelen is de correlatiecoëfficiënt r

$$r = \sqrt{1 - \frac{\sum (Y - \hat{Y})^2}{\sum (Y - \bar{Y})^2}} = \sqrt{1 - \frac{SS_2}{SS_1}} \quad (\text{vgl. 61})$$

Bij een perfecte correlatie is $r = 1$; geen correlatie tussen X en Y geeft $r = 0$. Een zeer interessante waarde geeft r^2 , die, bij vermenigvuldiging met 100, een idee geeft van het

inbrengpercentage van deze parameters in de correlatie. Een $(r^2 \times 100)$ -waarde van, bij voorbeeld, 70 wijst erop dat 70 % van het verband tussen de twee variabelen door deze vergelijking verklaard is.

Een ander probleem is het al dan niet significant zijn van een bepaalde correlatie. Inderdaad, r kan groot zijn en toch kan dit op een zuiver toeval berusten. Daarom is een F-toets nodig :

$$F_{k_2 - k_1, n - k_1} = \frac{SS_1 - SS_2}{SS_2} \cdot \frac{n - k_2}{k_2 - k_1} \quad (\text{vgl. 62})$$

met n : aantal punten

k_1 : aantal vrijheidsgraden in SS_1

k_2 : aantal vrijheidsgraden in SS_2

Hoe groter de F-waarde, hoe groter de kans dat de correlatie significant is. Deze F-waarde wordt niet alleen beïnvloed door de veranderingen van SS doch ook door het aantal vrijheidsgraden; inderdaad, hoe groter het aantal punten (n) en hoe minder parameters in de vergelijking (k), hoe groter de F-waarde wordt.

De inbreng van een tweede, derde of meerdere onafhankelijke veranderlijken in de correlatie leidt tot analoge vergelijkingen doch de berekeningen worden tamelijk langdradig. Algemeen is de oplossing van vgl. 54 een stelsel van n vergelijkingen met n onbekenden. Het aanwenden van een computer voor deze bewerkingen is dan bijna noodzakelijk.

Meestal wordt getracht in een eerste fase de afhankelijk veranderlijke te korreleren met alle mogelijks belangrijke onafhankelijk veranderlijken afzonderlijk in een lineaire regressie. De beste vergelijkingen worden dan verder bestudeerd door inbreng van een tweede, en eventueel meerdere, onafhankelijk veranderlijken. De inbreng van deze tweede, derde of volgende onafhankelijk veranderlijke in de vergelijking kan een verbetering teweeg brengen van r en/of s . Om de significantie van deze verbetering te bepalen kan men een F-toets toepassen

tussen de twee vergelijkingen:

$$F_{k_2 - k_1, n - k_1} = \frac{\sum (Y - \hat{Y})^2_{(X_1)} - \sum (Y - \hat{Y})^2_{(X_1, X_2)}}{\sum (Y - \hat{Y})^2_{(X_1, X_2)}} \cdot \frac{n - k_2}{k_2 - k_1} \quad (\text{vgl. 63})$$

met $\sum (Y - \hat{Y})^2_{(X_1)}$	= som der kwadraten van de vergelijking met X_1 als onafhankelijk veranderlijke
$\sum (Y - \hat{Y})^2_{(X_1, X_2)}$	= som der kwadraten van de vergelijking met X_1 en X_2 als onafhankelijk veranderlijken
n	= aantal punten
k_1	= aantal parameters in vgl. met X_1 (2, nl. X_1 en Y)
k_2	= aantal parameters in vgl. met X_1 en X_2 (3, nl. X_1 , X_2 en Y).

4. INTERCORRELATIES TUSSEN DE VERSCHILLENDE PARAMETERS

Het is van groot belang dat de fysicochemische en experimentele parameters, welke aangewend worden bij het uitvoeren der regressieanalyse, niet onderling in verband staan. Zo zou het onverantwoord zijn een regressievergelijking waar σ -waarden in voorkomen te verbeteren met een analoge elektronische parameter aangezien beiden onderling sterk gecorreleerd zijn. Dit geldt dus zowel voor de theoretische fysicochemische parameters (σ , σ^- , δ , π , E_s , MR) als voor de experimentele (I.R., $k_{\text{hydr.}}$, π_{GLC} , ΔR_M). Deze intercorrelaties zijn zeer misleidend bij het trekken van konklusies als ze optreden tussen parameters die verondersteld worden onafhankelijk van elkaar te zijn doch die door een ongelukkige substituentkeuze toch een toevallige afhankelijkheid vertonen. Zo zijn de σ - en π -waarden van een reeks alkylsubstituenten gelijklopend bij groeiende ketenlengte.

Tabel 19 stelt de intercorrelatiematrix voor van de lineaire vrije-energieparameters van de bestudeerde para-substituenten. Significante correlaties werden gevonden tussen alle elektronische parameters (σ , σ^- , δ , f en R) behalve tussen f en R

TABEL 19 : Intercorrelatie-matrix voor de lineaire vrije energie-konstanten

		σ	σ^-	δ	\mathcal{F}	\mathcal{R}	M.R.	E_S	π
ΔE	σ	1,000	0,977**	0,990**	0,820**	0,727**	0,049	0,354	0,248
	σ^-		1,000	0,966**	0,782**	0,743**	0,028	0,429	0,311
	δ			1,000	0,780**	0,761**	0,104	0,363	0,293
	\mathcal{F}				1,000	0,223	0,113	0,212	0,301
	\mathcal{R}					1,000	0,080	0,282	0,196
ΔS	M.R.						1,000	0,586	0,765**
	E_S							1,000	0,503
ΔH	π								1,000

** 99 % significantie

TABEL 20 : Correlatie -matrix tussen lineaire vrije energie-konstanten en experimentele parameters

	σ	σ^-	δ	\mathcal{F}	\mathcal{R}	M.R.	E_S	π
I.R.	0,851**	0,842**	0,829**	0,537	0,882**	0,112	0,276	0,356
$\log k_h$	0,985**	0,974**	0,978**	0,746**	0,767**	0,071	0,359	0,303
$\pi_{GLC_{OV101}}$	0,517	0,574	0,446	0,436	0,266	0,755**	0,700*	0,328
$\pi_{GLC_{OV125}}$	0,683	0,752	0,608	0,593	0,399	0,521	0,577	0,008
$\pi_{GLC_{DEGS}}$	0,756**	0,814**	0,682*	0,716*	0,396	0,370	0,490	0,136
$\Delta R_{Mpolyamide (Hex/HAc)}$	0,766**	0,829**	0,720*	0,715*	0,493	0,194	0,090	0,672*
$\Delta R_{Mpolyamide (ac./H_2O)}$	0,069	0,009	0,055	0,033	0,018	0,801**	0,579	0,939**
$\Delta R_{Mrev. phase}$	0,207	0,275	0,194	0,267	0,170	0,738**	0,506	0,993**

* 95 % significantie

** 99 % significantie

waar de faktorizatie van de elektronische invloeden in inductieve en resonantiefactoren zeer merkwaardig is. Opvallend is ook de geringe doch significante correlatie ($r = 0,765$) tussen π en M.R., wat erop wijst dat er een zekere sterische invloed is op de hydrofobe binding.

Correlaties van de lineaire vrije-energie parameters met de bekomen experimentele parameters geven eveneens belangrijke informatie zoals af te leiden valt uit de correlatiematrix van tabel 20.

I.R.-frequenties correleren zeer goed met de elektronische parameters :

			n	s	r	F	
I.R.-frok.	= 1210,20	+ 20,68 σ	11	4,569	0,851	20,98 ^{***}	(vgl. 64)
	= 1212,07	+ 50,54 δ	11	4,796	0,834	18,30 ^{***}	(vgl. 65)
	= 1216,03	+ 28,43 \mathcal{R}	11	4,028	0,843	22,13 ^{***}	(vgl. 66)
	= 1208,83	+ 13,01 \mathcal{F}	11	6,307	0,540	3,70	(vgl. 67)
	= 1213,36 + 25,89 \mathcal{R} + 8,68 \mathcal{F}		11	3,428	0,902	17,439 ^{***}	(vgl. 68)

n is het aantal verbindingen, r de correlatiecoëfficiënt, s de standaardafwijking en F de F-waarde. Hier blijkt ook het belang van resonantie-invloeden (vgl. 66), in tegenstelling met de inductieve die helemaal niet correleren (vgl. 67) zodat de combinatie van beide in vgl. 68 geen verbetering geeft in de correlatie.

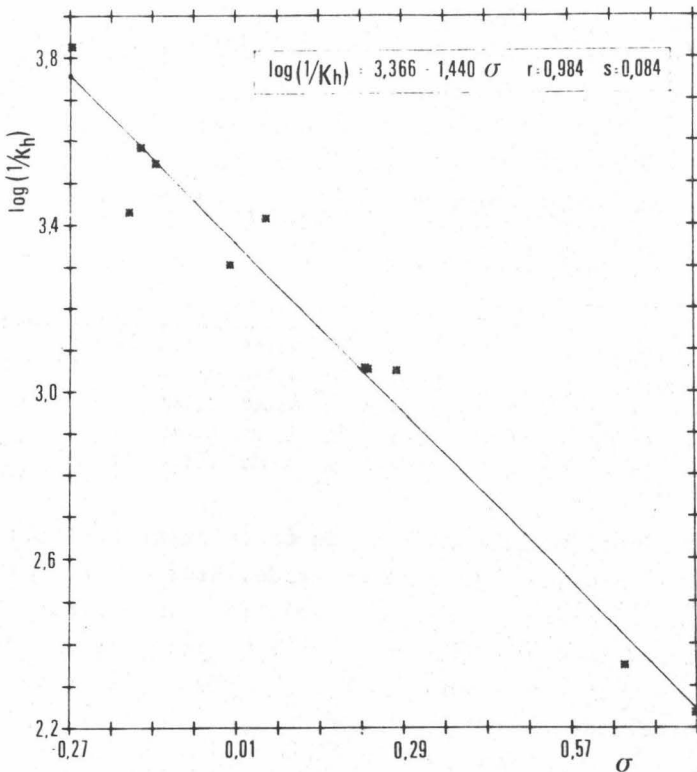
De hydrolysekonstante k_{hyd} is eveneens sterk afhankelijk van elektronische factoren, wat blijkt uit volgende correlaties :

	n	s	r	F	
$\log 1/k_{\text{hyd}} = 3,37 - 1,44 \sigma$	11	0,090	0,985	293,49 ^{***}	(vgl. 69)
$3,37 - 1,03 \sigma^-$	11	0,119	0,974	164,83 ^{***}	(vgl. 70)
$3,25 - 4,15 \delta$	11	0,110	0,978	196,83 ^{***}	(vgl. 71)
$3,56 - 0,86 \mathcal{F}$	11	0,349	0,746	11,27 ^{***}	(vgl. 72)
$2,91 - 2,00 \mathcal{R}$	11	0,336	0,767	12,87 ^{***}	(vgl. 73)
$3,25 - 1,11 \mathcal{F} - 1,69 \mathcal{R}$	11	0,069	0,992	253,92 ^{***}	(vgl. 74)

Kombinatie van \mathcal{F} en \mathcal{R} (vgl. 74) geeft wel een significante verbetering van de correlatie.

Ter illustratie wordt in fig. 25 en 26 het verband getoond tussen σ en hydrolysekonstanten en tussen de combinatie van \mathcal{F} en \mathcal{R} (vgl. 74) en de hydrolysekonstante.

Figuur 25 : Verband tussen σ -konstante en hydrolysekonstante van para-gesubstitueerde R^2 -derivaten



Ook het verband tussen hydrolysekonstanten en I.R.-frequenties is significant :

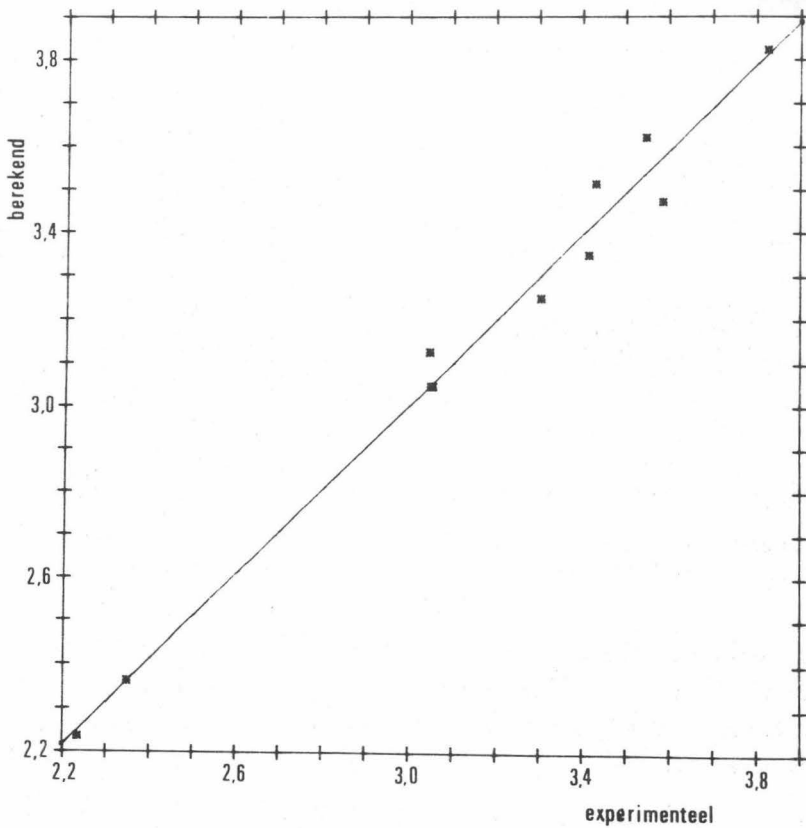
$$-\log k_{\text{hyd}} = 75,32 - 5,95 \text{ I.R.-fрек.}$$

n	s	r	F
11	0,276	0,850	23,421 ^{***}

(vgl. 75)

Experimentele π_{GLC} -waarden bekomen op een apolaire stationaire faze (OV101) vertonen enige relatie met sterische factoren :

Figuur 26 : Verband tussen experimenteel bepaalde en berekende hydrolysekonstanten



		n	s	r	F	
$\pi_{GLC_{OV101}} = 0,39 - 0,43$	E_S	11	0,516	0,700	8,65*	(vgl. 76)
$\pi_{GLC_{OV101}} = - 0,15 + 0,06$	M.R.	11	3,084	0,755	11,91**	(vgl. 77)

Naargelang de stationaire fase meer polair wordt speelt deze sterische invloed een geringer rol ten voordele van elektro-nische invloeden :

			n	s	r	F	
$\pi_{\text{GLC OV225}}$	$= -0,62 + 0,13$	M.R.	11	4,012	0,521	3,36	(vgl. 78)
	$= 0,54 - 0,80$	E_S	11	0,590	0,577	4,49	(vgl. 79)
	$= 0,21 + 1,33$	σ	11	0,262	0,683	7,86 ^{**}	(vgl. 80)
	$= 0,22 + 0,89$	σ^-	11	0,325	0,752	11,72 ^{**}	(vgl. 81)
$\pi_{\text{GLC DEGS}}$	$= 1,10 - 0,20$	M.R.	11	4,368	0,370	1,43	(vgl. 82)
	$= 0,56 - 0,97$	E_S	11	0,630	0,490	2,84	(vgl. 83)
	$= 0,22 + 1,27$	σ	11	0,235	0,756	11,98 ^{**}	(vgl. 84)
	$= 0,22 + 0,85$	σ^-	11	0,287	0,814	17,73 ^{**}	(vgl. 85)

Opvallend is het ontbreken van enig verband tussen π_{GLC} -waarden en de hydrofobe parameter π , wat er op wijst dat π_{GLC} helemaal geen goede parameter is voor hydrofobe krachten :

			n	s	r	F	
$\pi_{\text{GLC OV101}}$	$= -0,28 + 1,11 \pi$		11	0,573	0,328	1,084	(vgl. 86)
$\pi_{\text{GLC OV225}}$	$= -35,33 + 66,66 \pi$		11	0,606	0,008	0,001	(vgl. 87)
$\pi_{\text{GLC DEGS}}$	$= 2,62 - 4,16 \pi$		11	0,601	0,136	0,171	(vgl. 88)

ΔR_M -waarden bekomen op polyamide TLC-platen met n-hexaan-azijnzuur (95/5) als loopmiddel vertonen eveneens correlaties met elektronische parameters en in veel geringere mate met sterische factoren :

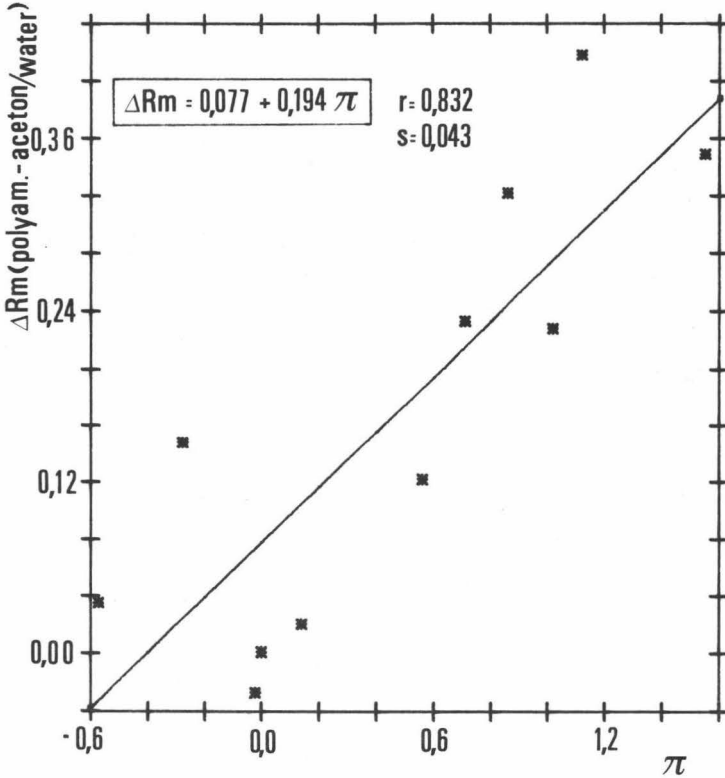
			n	s	r	F	
$\Delta R_M \text{ polyam. (Hex/HAc)}$	$= -0,04 + 1,00 \sigma$		11	0,230	0,766	12,81 ^{**}	(vgl. 89)
	$= 0,47 - 0,68 \pi$		11	0,449	0,672	7,42 ^{**}	(vgl. 90)

ΔR_M -waarden van polyamide-TLC met aceton-water (6/4) als loopmiddel vertonen daarentegen een sterke correlatie met hydrofobe parameters, en helemaal geen met elektronische invloeden. Wegens de reeds vermelde relatie tussen sterische en hydrofobe parameters is het ook logisch dat deze ΔR_M -waarden sterische invloeden ondergaan :

			n	s	r	F	
$\Delta R_M \text{ polyam. (aceton/water)}$	$= -0,73 + 6,67 \sigma$		11	0,358	0,069	0,04	(vgl. 91)
	$= 0,01 - 0,79 \pi$		11	0,203	0,832	37,61 ^{**}	(vgl. 92)
	$= -0,16 + 0,04 \text{ M.R.}$		11	2,815	0,801	16,10 ^{**}	(vgl. 93)

Het verband tussen ΔR_M polyamide (aceton/water) en π wordt geïllustreerd in fig. 27.

Figuur 27 : Verband tussen ΔR_M (polyamide - aceton/water) en π

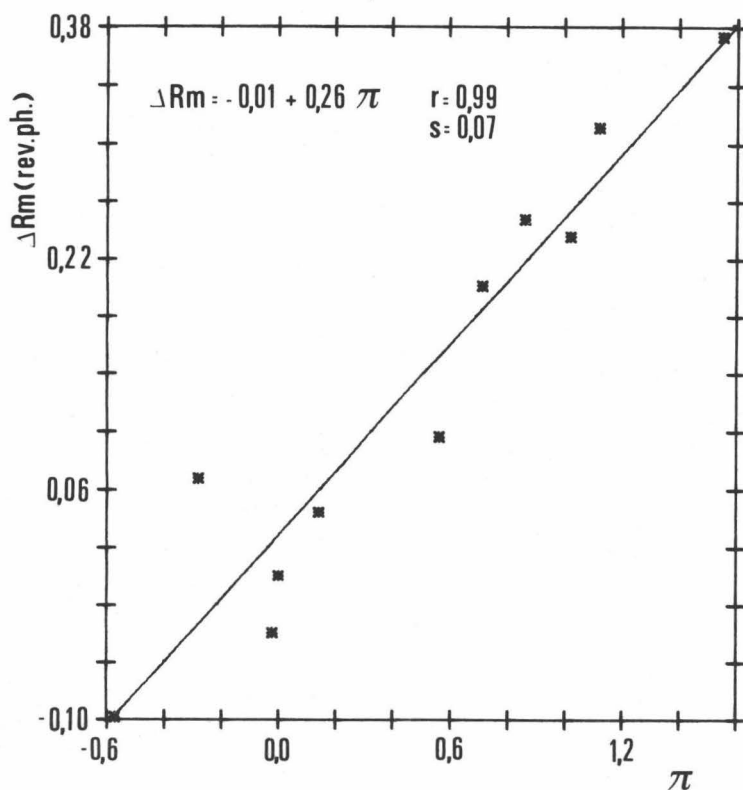


Een analoog gedrag kan afgeleid worden bij de ΔR_M -waarden bekomen bij reversed-phase TLC met water- aceton (4/6) als loopmiddel :

			n	s	r	F	
ΔR_M	Rev.ph. H_2O/ ac	= 0,43 - 2,18 σ	11	0,351	0,207	0,40	(vgl. 94)
		= - 0,01 + 0,26 π	11	0,070	0,993	659,36**	(vgl. 95)
		= - 0,22 + 0,05 M.R.	11	3,173	0,738	10,76**	(vgl. 96)

Fig. 28 toont het verband tussen deze ΔR_M -waarden en π . Dit wijst erop dat voor het bekomen van ΔR_M -waarden, welke repre-

Figuur 28 : Verband tussen ΔR_M (reversed phase - water/acetone)
en π



sentatief moeten zijn voor hydrofobe factoren, het loopmiddel voldoende polair moet zijn om een goed verdelingsproces tussen deze mobiele fase en de stationaire fase te bekomen.

5. KWANTITATIEVE STRUKTUUR-AKTIVITEITSRELATIES BIJ O-ALKYL-O-

ARYL FENYLFOSFONOTHIOATEN

Nadat alle mogelijke interacties tussen de verschillende parameters gekend zijn kan de biologische activiteit gecorreleerd worden met deze theoretische en experimentele fysicochemische parameters. De algemene Hansch-vergelijking, zoals afgeleid in l.e. is :

$$\log (1/C) = a\pi^2 + b\pi + c\sigma + dE_s + e\mu^2 + f(\Delta\alpha) + g \quad (\text{vgl. 49})$$

Het is vanzelfsprekend dat niet alle parameters eenzelfde invloed hebben in de correlatie en het is gebleken dat slechts enkele een significante inbreng aan de correlatie geven. Vooral μ^2 en α -waarden zijn tot nu toe zelden gebruikt wegens hun grotendeels elektronische afhankelijkheid en ook wegens het gebrek aan beschikbare waarden in de literatuur. Ook de π^2 -term, die meestal slechts wordt ingevoerd om korrelaties met π mogelijk te kunnen verbeteren, komt slechts sporadisch voor.

Om de bestpassende vergelijking te bekomen worden eerst de parameters één voor één gecorreleerd met de biologische activiteit. Dan wordt getracht de beste regressievergelijking te verbeteren door inbreng van een tweede parameter. Ook wordt getracht te starten met de reeks die qua structuur zo analoog mogelijk is, zoals één bepaalde substitutieplaats, en slechts daarna de reeks stelselmatig uit te breiden. In het geval van de fosforverbindingen die hier besproken worden ligt het voor de hand eerst de para-gesubstitueerde molekulen te onderzoeken, die de grootste reeks vormen (11 molekulen), daarna de meta- (6 molekulen) en de ortho-gesubstitueerde (6 molekulen). Slechts daarna wordt getracht de correlaties uit te breiden tot de ganse reeks.

a. Para-gesubstitueerde verbindingen

- Verband tussen de structuur en de in vitro werking

De belangrijkste lineaire regressies van de fysicochemische parameters met de biologische activiteit in vitro van de 11 para-gesubstitueerde verbindingen zijn als volgt :

			S	r	F	
ΔE	Theoretisch	$pI_{50} = 2,74 + 3,36 \sigma$	0,83	0,823	18,93	*** (vgl. 97)
		$pI_{50} = 2,69 + 2,59 \sigma^-$	0,70	0,876	29,76	*** (vgl. 98)
		$pI_{50} = 3,01 + 9,45 \delta$	0,88	0,800	15,95	*** (vgl. 99)
		$pI_{50} = 2,41 + 1,76 F$	1,23	0,544	3,77	(vgl. 100)
		$pI_{50} = 3,91 + 5,44 R$	0,97	0,748	11,43	*** (vgl. 101)
		$pI_{50} = 3,29 + 2,00 f + 4,85 R$	0,77	0,868	12,18	*** (vgl. 102)
	Experimenteel	$pI_{50} = -190,66 + 15,99 \text{ I.R.-frekw.}$	0,84	0,819	18,79	*** (vgl. 103)
		$pI_{50} = 10,68 - 2,36 \log 1/k_{\text{hyd.}}$	0,78	0,846	22,72	*** (vgl. 104)
		$pI_{50} = 1,88 + 3,33 \pi_{\text{GLC OV225}}$	0,97	0,748	11,43	*** (vgl. 105)
		$pI_{50} = 1,92 + 3,27 \pi_{\text{GLC DEGS}}$	0,94	0,768	12,94	*** (vgl. 106)
		$pI_{50} = 2,79 + 4,11 \Delta R_{\text{M polyam. hex/HAc}}$	0,93	0,773	13,37	*** (vgl. 107)
ΔH	Theoretisch	$pI_{50} = 3,59 - 0,68 \pi$	1,33	0,273	0,78	(vgl. 108)
	Experimenteel	$pI_{50} = 3,20 + 0,07 \Delta R_{\text{M polyam. H}_2\text{O/acet.}}$	1,46	0,008	0,01	(vgl. 109)
		$pI_{50} = 3,49 - 2,14 \Delta R_{\text{M rev. phase}}$	1,42	0,231	0,53	(vgl. 110)
ΔS	Theoretisch	$pI_{50} = 3,37 - 0,93 E_s$	1,30	0,460	2,42	(vgl. 111)
		$pI_{50} = 2,90 + 0,04 \text{ M.R.}$	1,45	0,129	0,15	(vgl. 112)
	Experimenteel	$pI_{50} = 1,96 + 3,96 \pi_{\text{GLC OV101}}$	1,17	0,595	4,94	(vgl. 113)

Wat direkt opvalt is dat uitsluitend elektronische parameters significante correlaties geven. 77 % van de I_{50} -resultaten zijn te verklaren door σ^- ($r^2 = 0,77$). In tabel 21 wordt het verschil gegeven tussen experimenteel bepaalde en berekende I_{50} -waarden zoals afgeleid van de hydrolysekonstante met vgl. 98.

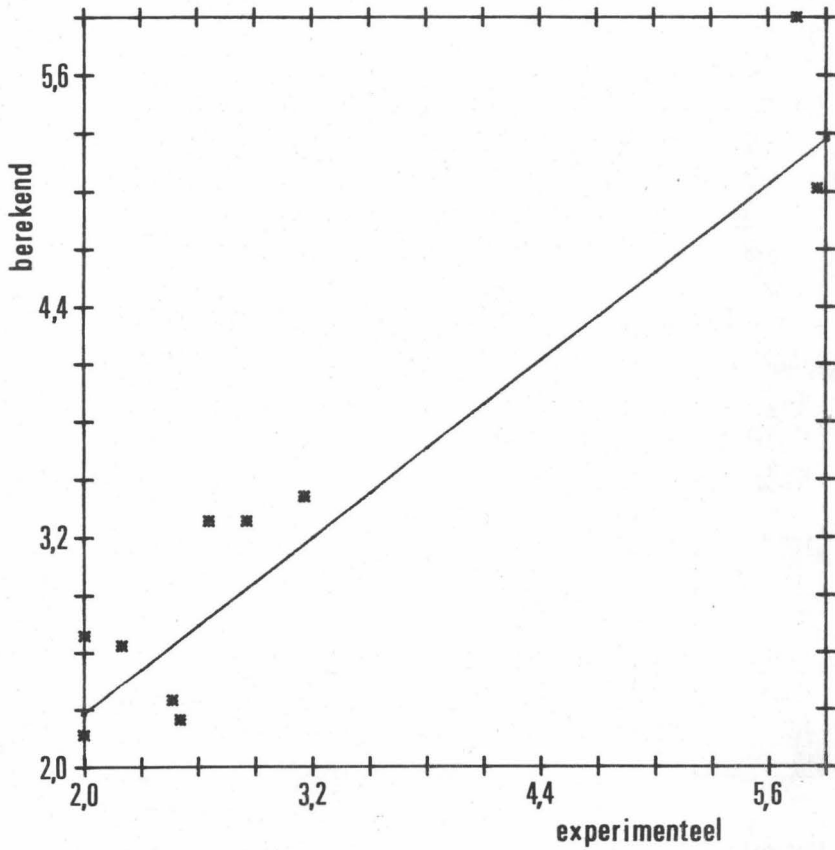
TABEL 21 : Vergelijking tussen experimenteel bepaalde en berekende in vitro inhibitie

Substituent	Nr.	pI_{50} experimenteel	pI_{50} berekend met vgl. 98	Δ Verschil
H	4a	2,000	2,884	0,884
CH ₃	4d	2,509	2,587	0,079
C ₂ H ₅	4t	3,824	2,226	1,598
C ₃ H ₇	4u	2,469	2,316	0,153
F	4q	2,201	2,625	0,424
Cl	4j	2,658	3,469	0,811
Br	4r	2,854	3,479	0,625
I	4s	3,155	3,486	0,331
OCH ₃	4g	2,000	1,655	0,345
CN	4m	5,854	5,137	0,317
NO ₂	4p	5,745	5,404	0,041

Dergelijk verband kan ook grafisch voorgesteld worden zoals in fig. 29, waar de experimentele en berekende I_{50} volgens vgl. 98 uitgezet zijn.

σ^- geeft betere correlaties dan σ omdat de "leaving group" in de reactie tussen de organofosforinhibitor en AChE het fenoxide-ion ($X-\phi-O^\ominus$) is dat een negatieve lading bezit welke gestabiliseerd kan worden door rechtstreekse resonantie-interacties met de substituent X. Dit wordt overigens bevestigd door de correlatie met R . Induktieve, sterische en hydrofobe factoren blijken onbelangrijk te zijn bij de in vitro inhibitie (vgl. 100, 108-113). Toevoeging van deze parameters in de vergelijking met elektronische parameters gaf geen verbetering van de regressie.

Figuur 29 : Verband tussen experimenteel bepaalde en berekende in vitro inhibitie volgens vgl. 2



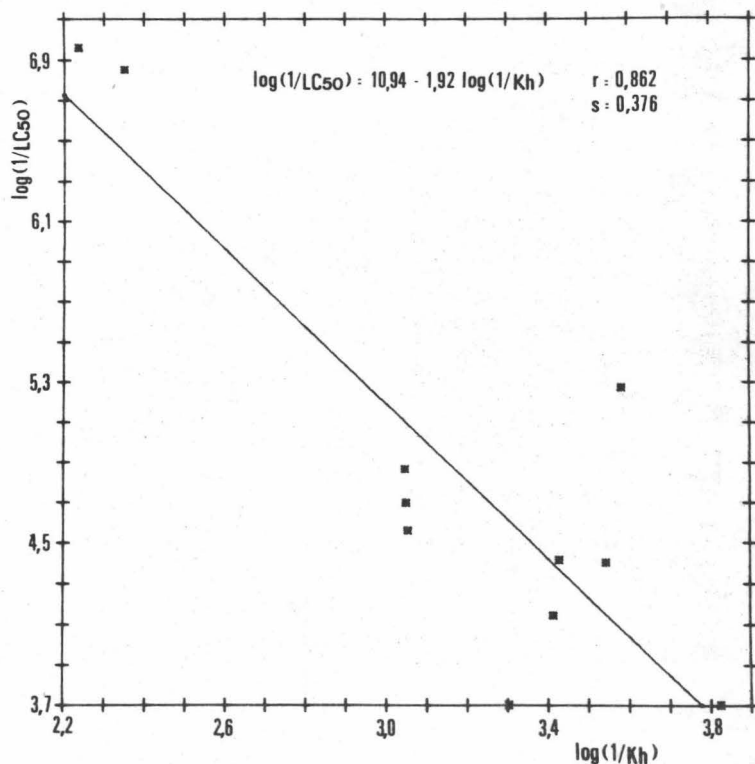
- Verband tussen de structuur en de in vivo werking

De lineaire regressievergelijkingen voor de in vivo inhibitie zijn als volgt :

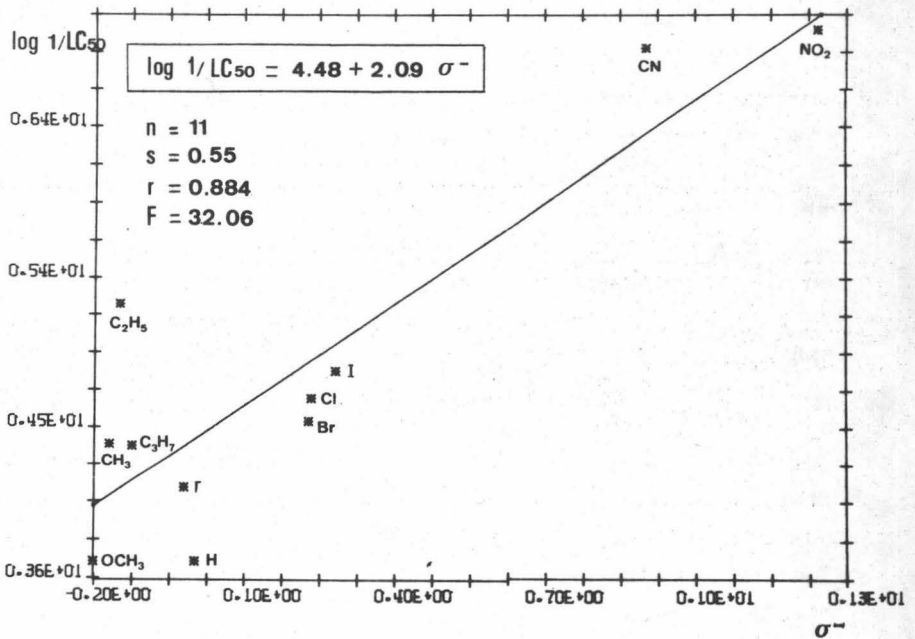
		$\log (1/LC_{50}) =$	s	r	F	
ΔE	Theoretisch	$4,49 + 2,73 \sigma$	0,63	0,840	21,56	*** (vgl. 114)
		$4,45 + 2,09 \sigma^-$	0,55	0,884	32,06	*** (vgl. 115)
		$4,71 + 7,73 \delta$	0,67	0,819	18,35	*** (vgl. 116)
		$4,21 + 1,46 \mathcal{F}$	0,96	0,566	4,23	(vgl. 117)
		$5,43 + 4,33 \mathcal{R}$	0,78	0,747	11,33	*** (vgl. 118)
		$4,91 + 1,69 \mathcal{F} + 3,83 \mathcal{R}$	0,60	0,874	12,92	*** (vgl. 119)
	Experimenteel	-151,11 + 12,86 I.R.-frekw.	0,66	0,826	19,30	*** (vgl. 120)
		$10,94 - 1,92 \log 1/k_h$	0,59	0,862	26,00	*** (vgl. 121)
		$3,81 + 2,65 \pi_{GLC}^{OV225}$	0,78	0,746	11,27	*** (vgl. 122)
		$3,85 + 2,59 \pi_{GLC}^{DEGS}$	0,76	0,761	12,40	*** (vgl. 123)
		$4,55 + 3,11 \Delta R_M^{poly(hex/HAc)}$	0,79	0,734	10,50	*** (vgl. 124)
ΔH	Theoretisch	$5,34 - 0,58 \pi$	1,10	0,303	0,81	(vgl. 125)
	Experimenteel	$4,77 + 0,59 \Delta R_M^{poly(H_2O/acet.)}$	1,16	0,081	0,06	(vgl. 126)
		$5,02 - 1,17 \Delta R_M^{rev. phase}$	1,15	0,161	0,24	(vgl. 127)
ΔS	Theoretisch	$5,02 - 0,85 E_S$	0,99	0,528	3,48	(vgl. 128)
		$4,57 + 0,04 M.R.$	1,15	0,161	0,24	(vgl. 129)
	Experimenteel	$3,84 + 3,26 \pi_{GLC}^{OV101}$	0,92	0,613	5,41	* (vgl. 130)

De in vivo aktiviteit wordt hoofdzakelijk bepaald door elektronische invloeden. 78 % van de correlatie ($r^2 = 0,78$) wordt verklaard door σ^- (vgl. 115). Van deze elektronische invloeden blijken de resonantieëffekten (R) het belangrijkste te zijn (vgl. 118). Ter illustratie wordt in fig. 30 het verband getoond tussen LC_{50} -waarden en de hydrolysekonstanten (vgl. 121) en in fig. 31 tussen LC_{50} -waarden en σ^- -konstanten. De analoge regressievergelijkingen bekomen bij in vivo- en in vitro-aktiviteit wijzen erop dat de penetratie en het transport van het insekticide naar de werkingsplaats (het AChE), geen remmende invloed blijken te hebben. Dit wordt eveneens aangetoond door het gebrek aan correlatie met hydrofobe parameters (vgl. 108-110 en 125-127).

Figuur 30 : Verband tussen hydrolyse-konstanten en in vivo-aktiviteit



Figuur 31 : Verband tussen σ^- -konstanten en in vivo-aktiviteit



Dat I₅₀⁻ en LC₅₀-waarden een bijna identiek beeld geven van de toxiciteit blijkt uit volgende vergelijking :

$$\log 1/LC_{50} = 2,33 + 0,79 pI_{50}$$

s	r	F
0,14	0,994	625,95

(vgl. 131)

Er blijkt dus weinig verschil te zijn tussen de afbraak of het metabolisme bij de in vivo en de in vitro werking. De zeer hoge correlatie is des te opvallender als men weet dat de in vitro toxiciteit bepaald is na chemische omzetting tot het P = 0 derivaat. Deze omzetting werd niet uitgevoerd voor de LC₅₀-bepaling, wat duidt op een volledige biochemische oxydatie tot het oxon in het insectenlichaam.

De ρ -waarden bij de korrelatie van σ^- met de hydrolysekonstanten, de I_{50} -waarde en de LC_{50} -waarden zijn resp. 1,03, 2,59 en 2,09. Deze betrekkelijk gelijkende waarden wijzen erop dat de betrokken reakties, nl. alkalische hydrolyse, reactie met AChE en de in vivo toxische reakties, van hetzelfde type zijn. Toch is de ρ -waarde bij de I_{50} - en LC_{50} -waarden iets groter dan bij de hydrolyse-konstante. Dit is in overeenkomst met de vaststelling dat ρ -waarden groter zijn voor reakties in apolair milieu (91). ρ is voor eenzelfde systeem groter in niet-waterige solventen dan in waterige of polair milieu. Zo is de ρ -waarde van de alkalische hydrolyse van aryl- $CONH_2$ in water 1,06 en in 60 % ethanol 1,36. Het is dus logisch dat de ρ -waarde bij de hydrolyse in alkalisch milieu kleiner is dan bij I_{50} -waarden (pH 7) en de LC_{50} -waarden (biologisch milieu).

De grote analogie tussen $\rho_{I_{50}}$ en $\rho_{LC_{50}}$ is een bewijs te meer dat beide reakties van hetzelfde type zijn en dat deze organofosforverbindingen in beide gevallen reageren met eenzelfde nukleofiele groep, nl. de serinehydroxylgroep van het AChE. Toch is het niet onaanvaardbaar te veronderstellen dat bij de mortaliteit van insecten, veroorzaakt door organofosforverbindingen, de inhibitie van een reeks andere enzymen, welke eveneens nukleofielen bevatten, een rol kan spelen. Men mag niet besluiten dat, wegens de gelijkende ρ -waarden bij I_{50} en LC_{50} , de sterfte uitsluitend te wijten is aan remming van AChE. Toch is het zeer bemoedigend dat de elektronische invloeden van substituenten in een zeer complex middel (zoals het insectenlichaam) analoog en bijna identiek zijn met geïsoleerde systemen (in vitro werking) of zelfs zuiver scheikundige reakties (zoals de hydrolyse in bufferoplossingen). Daarenboven is een LD_{50} -bepaling nu niet direkt vergelijkbaar met een kolorimetrische of een gaschromatografische bepaling ! Toch blijkt de zichtbare uitwerking van een organofosforverbinding op een huisvlieg een kwantitatieve aanduiding te geven van reakties die op molekulair niveau optreden in het insectenlichaam.

b. Ortho- en meta-gesubstitueerde R^2 -verbindingen

Als volgende stap om een algemene correlatie te bekomen worden de meta- en ortho-gesubstitueerde verbindingen gecorreleerd.

Wegens het ontbreken van sommige fysicochemische parameters in de literatuur (zoals σ^- , \mathcal{F} , \mathcal{R} , M.R. en E_S) en wegens het kleiner aantal gesynthetiseerde verbindingen (6 voor ortho- en voor meta) is met deze correlaties voorzichtigheid aangewezen. Toch blijkt opnieuw dat elektronische invloeden veruit het belangrijkste zijn en dat ze gelijkaardige reacties geven als bij de para-gesubstitueerde verbindingen.

Voor de meta-gesubstitueerde verbindingen zijn volgende significante vergelijkingen gevonden:

		S	r	F		
pI_{50}	$= 2,00 + 4,68 \sigma$	0,37	0,976	80,06	***	(vgl. 132)
	$1,99 + 15,25 \delta$	0,33	0,981	100,17	***	(vgl. 133)
	$14,15 - 3,43 \log 1/k_{hyd.}$	0,67	0,919	21,70	***	(vgl. 134)
	$1,88 + 3,89 \pi_{GLC_{OV225}}$	0,99	0,814	7,84	*	(vgl. 135)
$\log 1/LC_{50}$	$= 3,72 + 3,98 \sigma$	0,33	0,974	73,13	***	(vgl. 136)
	$3,71 + 12,93 \delta$	0,31	0,977	84,92	***	(vgl. 137)
	$13,89 - 2,86 \log 1/k_{hyd.}$	0,62	0,902	17,43	*	(vgl. 138)
$\log 1/LC_{50}$	$= 2,02 + 0,85 pI_{50}$	0,08	0,999	1345,42	***	(vgl. 139)

De ortho-gesubstitueerde verbindingen geven analoge correlaties :

		S	r	F		
pI_{50}	$= 2,63 + 6,09 \delta$	0,87	0,869	12,33	*	(vgl. 140)
	$10,36 - 2,41 \log 1/k_{hyd.}$	0,46	0,965	53,91	***	(vgl. 141)
	$1,56 + 4,84 \pi_{GLC_{OV225}}$	0,86	0,871	12,61	*	(vgl. 142)
	$1,71 + 4,46 \pi_{GLC_{DEGS}}$	0,84	0,877	13,32	*	(vgl. 143)
	$1,99 + 5,47 \Delta R_M^{poly \text{ hex/HAc}}$	0,80	0,890	15,20	*	(vgl. 144)
$\log 1/LC_{50}$	$= 4,32 + 4,99 \delta$	0,71	0,871	12,55	*	(vgl. 145)
	$10,62 - 1,97 \log 1/k_{hyd.}$	0,39	0,962	49,25	***	(vgl. 146)
	$3,41 + 4,07 \pi_{GLC_{OV225}}$	0,63	0,897	16,50	*	(vgl. 147)
	$3,54 + 3,75 \pi_{GLC_{DEGS}}$	0,62	0,902	17,44	*	(vgl. 148)
	$3,77 + 4,58 \Delta R_M^{poly \text{ hex/HAc}}$	0,59	0,911	19,56	*	(vgl. 149)
$\log 1/LC_{50}$	$= 2,18 + 0,82 pI_{50}$	0,12	0,997	602,78	***	(vgl. 150)

De richtingscoëfficiënten voor het verband tussen twee elektronische parameters (k_{hyd} en δ en de toxiciteit (in vivo en in vitro) van O-, m- en p-substitutie zijn samengebracht in tabel 22.

TABEL 22 : Overzicht van de ρ -konstanten voor ortho-, meta- en para-substituenten

	O	m	p
$I_{50} \sim k_{\text{hyd}}$	2,41	3,43	2,36
$LC_{50} \sim k_{\text{hyd}}$	1,97	2,86	1,92
$I_{50} \sim \delta$	6,09	15,25	9,45
$LC_{50} \sim \delta$	4,99	12,93	7,73

De waarden voor meta-substitutie zijn opvallend groter dan voor ortho- en para-substitutie, wat erop zou kunnen wijzen dat er bij de toxische werking van meta-substituenten nog een ander mechanisme een rol speelt, zoals het ontstaan van een positieve lading welke kan interfereren met de anionische bindingsplaats van AChE. Dit wordt verder bevestigd bij de M.O.-methode (Hoofdstuk III).

c. Totaalcorrelatie

Daar de correlaties tussen elektronische parameters en toxiciteit van de verschillende substitutieplaatsen eenzelfde beeld geven is het mogelijk de correlaties te onderzoeken van alle gesynthetiseerde verbindingen samen, dus met O-, m- en p-substitutie van R^2 en diverse alkylgroepen als R^1 . Wegens het ontbreken in de literatuur van de meeste fysicochemische parameters van ortho-substituenten kan geen beroep gedaan worden op σ , σ^- , f en R van de elektronische invloeden. Alleen de δ -waarden zijn nog beschikbaar, doch deze geven slechts geringe correlaties ($r = 0,65$). Interessanter vergelijken wer-

den bekomen met de experimentele elektronische parameters voor 24 verbindingen :

		s	r	F		
PI_{50}	$= 11,34 - 2,55 \log 1/k_{hyd}$	0,71	0,884	78,27	***	(vgl. 151)
	$1,76 + 4,15 \pi_{GLC}$	0,91	0,801	41,26	***	(vgl. 152)
	$1,90 + 3,89 \pi_{GLC}^{OV225}$	0,90	0,808	43,23	***	(vgl. 153)
	$2,79 + 3,93 \Delta R_M^{DEGS}$	1,00	0,759	29,87	***	(vgl. 154)
	$poly\ hex/HAc$					
$\log 1/LC_{50}$	$= 11,38 - 2,06 \log 1/k_{hyd}$	0,56	0,888	82,39	***	(vgl. 155)
	$3,38 + 3,03 \pi_{GLC}$	0,74	0,796	39,88	***	(vgl. 156)
	$3,79 + 3,09 \pi_{GLC}^{OV225}$	0,73	0,801	41,27	***	(vgl. 157)
	$4,52 + 3,05 \Delta R_M^{DEGS}$	0,84	0,735	25,82	***	(vgl. 158)
	$poly\ hex/HAc$					
$\log 1/LC_{50}$	$= 2,28 + 0,80 PI_{50}$	0,11	0,995	2633,31	***	(vgl. 159)

Het verband tussen experimentele en berekende waarde volgens vgl. 155 is afgebeeld in fig. 32.

Een mogelijke verklaring waarom de correlaties beter zijn met hydrolysekonstanten dan met δ is misschien te vinden in het groter verschil tussen de richtingscoëfficiënten bij meta-substitutie enerzijds en para- en ortho-substitutie anderzijds.

De in vitro en in vivo toxiciteit van deze fosfonothioaten kan voor meer dan 78 % ($r^2 = 0,78$) verklaard worden door elektronische invloeden welke ook de hoofdrol spelen bij de hydrolyse van deze verbindingen. De resterende 22 % blijven nog onverklaarbaar doch een deel daarvan is natuurlijk te wijten aan experimentele fouten. Het andere deel is mogelijks te wijten aan invloeden, zoals specifieke interacties tussen de organofosformolekule en het AChE. Dit is echter onmogelijk te benaderen met fysicochemische parameters. Een manier om dit te verklaren is misschien te vinden in molekule-orbitaal berekeningen zoals besproken in hoofdstuk III.

HOOFDSTUK II : HET MATHEMATISCH MODEL VOLGENS FREE EN WILSON

1. OPSTELLEN VAN HET MODEL VAN FREE EN WILSON

Onafhankelijk van het Hansch-model werd een tweede methode voor structuur-activiteitsanalyse voorgesteld door Bruice (103). De mathematische uitwerking van deze empirische methode gebeurde in 1964 door Free en Wilson (104). In deze methode worden geen fysicochemische parameters aangewend, doch een reeks de novo-substituentkonstanten, afgeleid van de experimentele biologische activiteiten. Er zijn enkele belangrijke vooropzettingen verbonden aan deze methode : de bijdrage in biologische activiteit van de substituenten op de basismolekule moet additief en konstant zijn, onafhankelijk van de substitutie in de rest van de molekule. Voor een reeks van N molekulen wordt de biologische activiteit (BA) voor elke molekule (n) uitgedrukt als :

$$BA_n = \sum_p \sum_s a_n(ps) + \mu \quad (n = 1, 2, \dots, N) \quad (\text{vgl. 160})$$

met μ : de biologische activiteit van de basismolekule (niet gesubstitueerd)

$a_n(ps)$: activiteitsbijdrage van een substituent s op positie p.

Door de som der activiteitsbijdragen van de M beschouwde substituenten op elke substitutiepositie van de molekule gelijk te stellen aan nul is μ de gemiddelde biologische activiteit:

$$\sum_s a_m(ps) = 0 \quad m = (1, 2, \dots, M) \quad (\text{vgl. 161})$$

De activiteitsbijdrage a_{ps} kan beschouwd worden als het produkt van $G_{ps} \cdot X_{ps}$, X zijnde 1 of 0 naargelang een substituent s al dan niet aanwezig is op een bepaalde substitutieplaats p, en G zijnde de gewichtsfaktor van de biologische activiteit veroorzaakt door een substituent s op substitutieplaats p, zodanig dat de totale inbreng van de substituenten op een substitutieplaats over de ganse reeks gelijkgesteld is aan nul.

$$\sum_s G_{ps} = 0 \quad (\text{vgl. 162})$$

G kan bekomen worden door het oplossen van een stelsel van N vergelijkingen met $\sum_p m(p)$ onbekenden : de de novo substituentkonstanten van elke beschouwde substituent op elke beschouwde substitutieplaats. Aan de hand van deze substituentkonstanten kan van alle mogelijke combinaties van substituenten de biologische activiteit berekend worden.

Ter illustratie, een eenvoudig voorbeeld van een reeks van vier molekulen met 2 substitutieplaatsen (a en b) waarop telkens twee substituenten (A en B voor a en C en D voor b) kunnen voorkomen.

De algemene vergelijking is :

$$BA : \mu + aA + aB + bC + bD \quad (\text{vgl. 163})$$

met BA : biologische activiteit

μ : totale gemiddelde activiteit

aA : aktiviteitsbijdrage van substituent A op positie a

aB : aktiviteitsbijdrage van substituent B op positie a

bC : aktiviteitsbijdrage van substituent C op positie b

bD : aktiviteitsbijdrage van substituent D op positie b

Substitutie van de experimenteel bepaalde biologische activiteit geeft vier vergelijkingen :

$$\begin{aligned} A_1 &= \mu + aA + bC \\ A_2 &= \mu + aB + bC \\ A_3 &= \mu + aA + bD \\ A_4 &= \mu + aB + bD \end{aligned} \quad (\text{vgl. 164})$$

Daarenboven is per definitie (vgl. 161) :

$$\begin{aligned} aA + aB &= 0 \\ bC + bD &= 0 \end{aligned} \quad (\text{vgl. 165})$$

Men bekomt een stelsel van zes vergelijkingen met 5 onbekenden. Men heeft slechts drie experimenteel bepaalde biologische akti-

viteiten nodig om de vier aktiviteitsbijdragen te berekenen.

De methode van Free en Wilson biedt verschillende voordelen :

- 1° - Buiten de biologische responsie, moet geen beroep gedaan worden op parameters. Dit biedt vooral voordeel voor complexe molekulen waarvoor geen fysicochemische, experimentele of quantummechanische parameters bekend zijn.
- 2° - De de novo -konstanten omvatten alle eigenschappen van de substituent, dus zowel hydrofobe, elektronische, sterische als onbekende.

Nadelen zijn er ook :

- 1° - De de novo-konstanten zijn niet specifiek zodat ze geen informatie geven omtrent de aard van de fysicochemische inbreng van elke substituent.
- 2° - De de novo-konstanten bekomen uit een bepaalde reeks molekulen zijn niet toepasselijk op een andere reeks.
- 3° - De grootste beperking van deze methode ligt echter in de noodzaak dat de inbreng van elke substituent additief en konstant moet zijn. Hierdoor worden vele gevallen uitgesloten o.m. deze waar de biologische aktiviteit parabolisch afhankelijk is van de π -konstante.

2. INTERKORRELATIE VAN HET HANSCH-MODEL MET HET FREE EN WIL-

SON-MODEL

Wegens de totaal verschillende benadering van het verband tussen structuur en aktiviteit bij de methode van Free en Wilson enerzijds, en de lineaire vrije energie-relatie van Hansch anderzijds, werden deze twee technieken volledig apart aangewend. Daar bij de Hansch-methode aanvankelijk π - en σ -waarden in de literatuur ontbraken, bleek dat mathematische modellen, zoals dit van Free en Wilson, gemakkelijker uit te voeren waren; doch anderzijds geven ze geen informatie omtrent de eigenlijke fysicochemische inbreng van elk substituent. Het

is daarom zeer interessant deze twee methodes te vergelijken en eventueel de analogie of de tegenstrijdigheden op te sporen.

Veronderstel een theoretisch geval : een molekulen met twee substitutieplaatsen X en Y met resp. x en y als substituent. De Free en Wilson vergelijking is dus :

$$BA = \mu + a_{x,X} + a_{y,Y} \quad (\text{vgl. 166})$$

De meest klassieke Hansch-vergelijking is lineair in π , σ en E_S :

$$BA = a + b\pi + c\sigma + dE_S \quad (\text{vgl. 167})$$

In dit voorbeeld wordt dit :

$$BA = a + b(\pi_x + \pi_y) + c(\sigma_x + \sigma_y) + d(E_{S_x} + E_{S_y}) \quad (\text{vgl. 168})$$

of

$$BA = a + e(\pi_x + \sigma_x + E_{S_x}) + f(\pi_y + \sigma_y + E_{S_y}) \quad (\text{vgl. 169})$$

Met beide methodes bekomt men een vergelijking (resp. 166 en 169) bestaande uit drie termen :

- 1° - een konstante term (μ in vgl. 166 en a in vgl. 169)
- 2° - een term alleen afhankelijk van de substituent x
- 3° - een term alleen afhankelijk van de substituent y

Hieruit blijkt dat in beide gevallen de inbreng van elke substituent onafhankelijk is van deze van een andere substituent, zodat de voorwaarde van de Free en Wilson-methode qua additiviteit en konstante inbreng ook toepasselijk is bij de Hansch benadering. Het is dus mogelijk de de novo-substituentkonstanten van Free en Wilson te correleren met fysicochemische parameters zoals π , σ en E_S .

Bij de Hansch-methode treedt echter dikwijls een parabolisch verband met π op. De vraag stelt zich nu of, in het geval dat de waargenomen biologische activiteit deze parabolische funk-

tie van π vertoont, de Free en Wilson methode nog toepasselijk is.

Veronderstel een volgende Hansch vergelijking :

$$BA = a\pi^2 + b\pi + c \quad (\text{vgl. 170})$$

In hetzelfde voorbeeld wordt dit dan :

$$BA = a(\pi_x + \pi_y)^2 + b(\pi_x + \pi_y) + c \quad (\text{vgl. 171})$$

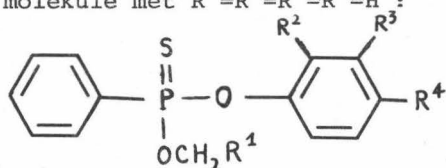
of

$$BA = a\pi_x^2 + b\pi_x + a\pi_y^2 + b\pi_y + 2a\pi_x\pi_y + c \quad (\text{vgl. 172})$$

Hieruit blijkt dat in dit geval de additiviteit en de konstante inbreng van de substituenten niet meer opgaat want de term $2a\pi_x\pi_y$ toont duidelijk een onderlinge afhankelijkheid der twee substituenten zodat de Free en Wilson-methode niet toepasselijk is.

3. PROCEDURE

De procedure van de Free en Wilson-methode kan best uitgelegd worden aan de hand van een voorbeeld. Als basismolekule beschouwt men volgende molekule met $R^1=R^2=R^3=R^4=H$:



Men beschikt over de biologische aktiviteit van 19 molekulen met 2 R^1 -groepen ($-\text{CH}_3$, $-\text{C}_2\text{H}_5$), 5 R^2 -groepen ($-\text{CH}_3$, $-\text{Cl}$, $-\text{OCH}_3$, $-\text{CN}$, $-\text{NO}_2$), 5 R^3 -groepen ($-\text{CH}_3$, $-\text{OCH}_3$, $-\text{Cl}$, $-\text{CN}$, $-\text{NO}_2$), 5 R^4 -groepen ($-\text{CH}_3$, $-\text{OCH}_3$, $-\text{Cl}$, $-\text{CN}$, $-\text{NO}_2$). De structurele matrix is voorgesteld in tabel 23.

Zo heeft, bij voorbeeld, molekule 4p een ethoxygroep op de fosfor en een para-nitrogroep op het P-O-aryl gedeelte. Deze matrix geeft de juiste omschrijving van alle 19 molekulen. Waterstof wordt niet beschouwd als een substituent want indien het wel als substituent beschouwd wordt dan zou de bekomen μ -waarde in feite de biologische aktiviteit van een hypothetische molekule zijn welke geen substituent bevat op de beschouwde substitutieplaatsen. In dit geval zou men de de novo-substituentkonstante

TABEL 23 : Strukturele matrix van de Free en Wilson procedure

Nr	R ¹		R ²					R ³					R ⁴					B.A. log 1/LC ₅₀
	-CH ₃ I	-C ₂ H ₅ II	-CH ₃ III	-OCH ₃ IV	-Cl V	-CN VI	-NO ₂ VII	-CH ₃ VIII	-OCH ₃ IX	-Cl X	-CN XI	-NO ₂ XII	-CH ₃ XIII	-OCH ₃ XIV	-Cl XV	-CN XVI	-NO ₂ XVII	
4a	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,700
4b	1,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,700
4c	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,700
4d	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,415
4e	1,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,919
4f	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,700
4g	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	3,700
4h	1,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,407
4i	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,410
4j	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	4,555
4k	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,381
4l	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,189
4m	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	6,848
4n	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,345
4o	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,350
4p	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	6,956
4v	1,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	6,031
4y	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	6,835
4z	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	6,465
	17	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	3	1	

van waterstof moeten optellen bij μ om de aktiviteit van de niet-gesubstitueerde molekulen te bekomen. Om dit te vermijden en om de bekomen substituentkonstanten op een relatieve schaal t.o.v. de ongesubstitueerde molekulen te plaatsen wordt meestal de substituentkonstante voor H gelijkgesteld aan nul door ze niet op te nemen als een kolom in de structurele matrix.

Deze matrix dient als input voor een computerprogramma om de oplossing te bekomen van volgende vergelijking met de methode der kleinste kwadraten :

$$\log (1/C) = \mu + \sum_i G_i X_i \quad (\text{vgl. 173})$$

$$G_i = \text{I, II, ..., XVII}$$

$$i = 1, 2, \dots, 19$$

$$\mu = \text{algemeen gemiddeld } \log (1/C)$$

Daarenboven moet nog rekening gehouden worden met volgende vergelijkingen :

$$\text{voor } R_1 : 17 \text{ I} + \text{II} = 0 \quad \text{of } \text{I} = - \text{II}/17$$

$$\text{voor } R_2 : \text{III} + \text{IV} + 2 \text{ V} + \text{VI} + \text{VII} = 0 \text{ of } \text{III} = - \text{IV} - 2 \text{ V} - \text{VI} - \text{VII}$$

$$\text{voor } R_3 : \text{VIII} + \text{IX} + \text{X} + \text{XI} + \text{XII} = 0 \text{ of } \text{VIII} = - \text{IX} - \text{X} - \text{XI} - \text{XII}$$

$$\text{voor } R_4 : \text{XIII} + \text{XIV} + 2 \text{ XV} + 3 \text{ XVI} + \text{XVII} = 0 \text{ of } \text{XIII} = - \text{XIV} - 2 \text{ XV} - 3 \text{ XVI} - \text{XVII}$$

Deze zgn. 'restriktieve' vergelijkingen geven het verband tussen de variabelen zodat telkens één onbekende per substitutieplaats geëlimineerd kan worden. In totaal zijn er $(2 - 1) + (5 - 1) + (5 - 1) + (5 - 1) = 13$ onbekenden die samen met μ moeten berekend worden. In dit voorbeeld moeten dus minstens 14 molekulen in de matrix opgenomen zijn om tot een oplossing te kunnen komen. Doch, daar de biologische aktiviteiten een experimentele fout bevatten en ook een zekere graad van benadering hebben zijn een aantal aanvullende molekulen gewenst. Best is het aantal molekulen dat in de berekening opgenomen wordt het dubbele is van het minimum vereiste aantal, dus hier $14 \times 2 = 28$.

Bij het opstellen van een speciaal computerprogramma van het model van Free en Wilson kan men de restriktieve vergelijkingen direkt opnemen in de matrix door telkens de eerste substituentkolom van een substitutieplaats te elimineren en de korresponderende waarde van de andere substituentkolommen te vervangen door de gewichtsfactoren van de restriktieve vergelijkingen. Zo wordt de structurele matrix omgezet in een verkorte vorm zoals geïllustreerd in tabel 24.

Door de methode der kleinste kwadraten bekomt men een oplossing voor μ en voor de 14 de novo-substituentparameters, eveneens de correlatiecoëfficiënt r en de F -waarde. In dit voorbeeld met $(2 - 1) + (5 - 1) + (5 - 1) + (5 - 1) = 13$ vrijheidsgraden toe te schrijven aan de regressie en $19 - 1 = 18$ vrijheidsgraden in het model heeft men $18 - 13 = 5$ vrijheidsgraden van de fout-term. De bekomen F -waarde moet dus groter zijn dan de $F_{5,13}$ -waarde in de tabellen van 1 of 5 % significantie.

Met de de novo-substituentkonstanten van dit voorbeeld kan de biologische aktiviteit berekend worden van $3 \times 6 \times 6 \times 6 = 648$ analoge verbindingen. Alles hangt echter af van de additiviteit van de bekomen de novo-konstanten en van de statistische parameters van de correlatie (s , r en F).

4. RESULTATEN EN BESPREKING

Een Fortran IV-programma werd opgesteld voor de berekeningen van het Free en Wilson mathematisch model volgens de structurele matrix in tabel 23. Als veranderlijke parameters werden de in vivo toxiciteit ($\log 1/LC_{50}$), de in vitro toxiciteit (pI_{50}) en de hydrolysekonstante ($\log 1/k_{hydr.}$) aangewend. De resultaten zijn samengebracht in tabel 25.

Alleen de F -toets voor de correlatie met de hydrolyse blijkt significant te zijn. Het verband tussen berekende en experimentele hydrolysekonstanten volgens het Free en Wilson-model wordt geïllustreerd in fig. 33.

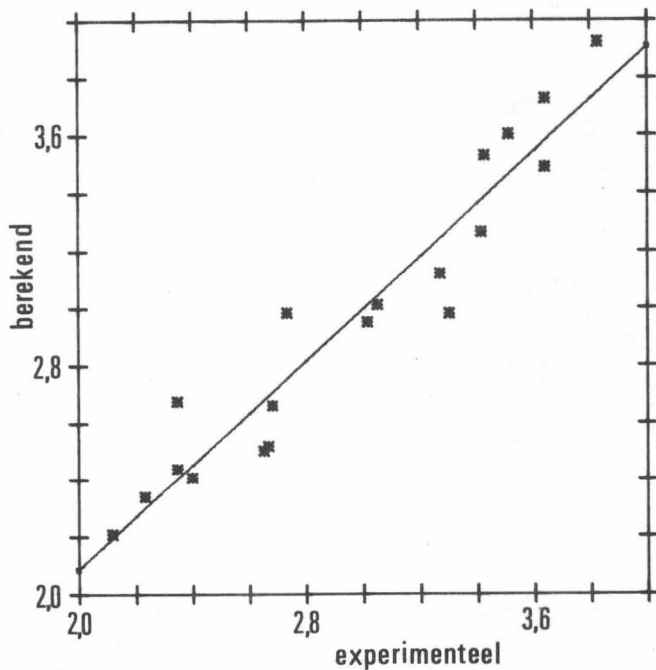
TABEL 24 : Verkorte structurele matrix van de Free en Wilson
procedure

Nr	R ¹	R ²				R ³				R ⁴				B.A. log 1/LC ₅₀
	-C ₂ H ₅ II	-OCH ₃ IV	-Cl V	-CN VI	-NO ₂ VII	-OCH ₃ IX	-Cl X	-CN XI	-NO ₂ XII	-OCH ₃ XIV	-Cl XV	-CN XVI	-NO ₂ XVII	
<u>4a</u>	-1/17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3,700
<u>4b</u>	-1/17	-1	-2	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	3,700
<u>4c</u>	-1/17	0	0	0	0	-1	-1	-1	-1	0	0	0	0	3,700
<u>4d</u>	-1/17	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	-2	-3	-1	4,415
<u>4e</u>	-1/17	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3,919
<u>4f</u>	-1/17	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	3,700
<u>4g</u>	-1/17	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	3,700
<u>4h</u>	-1/17	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4,407
<u>4i</u>	-1/17	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	5,410
<u>4j</u>	-1/17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	4,555
<u>4k</u>	-1/17	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6,381
<u>4l</u>	-1/17	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	6,189
<u>4m</u>	-1/17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	6,848
<u>4n</u>	-1/17	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	6,345
<u>4o</u>	-1/17	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	6,350
<u>4p</u>	-1/17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	6,956
<u>4v</u>	-1/17	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	6,031
<u>4y</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	6,835
<u>4z</u>	+1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	6,465

TABEL 25 : De de novo-konstanten van de Free en Wilson-methode

	1° <u>in vivo</u> toxiciteit	2° <u>in vitro</u> toxiciteit	3° hydrolyse- konstante
μ	5,242	3,758	2,963
X voor I : $R_1 = \text{CH}_3$ II : $R_1 = \text{C}_2\text{H}_5$	- 0,018 0,309	- 0,017 0,290	0,015 0,254
III : o - CH_3 IV : o - OCH_3 V : o - Cl VI : o - CN VII : o - NO_2	- 1,511 - 1,292 0,250 1,170 1,134	- 1,713 - 1,713 0,276 1,467 1,406	0,623 0,748 - 0,029 - 0,542 - 0,772
VIII : n- CH_3 IX : m- OCH_3 X : m-Cl XI : m-CN XII : m- NO_2	- 1,370 - 1,370 0,340 1,119 1,280	- 1,585 - 1,585 0,239 1,374 1,558	0,509 0,288 0,141 - 0,476 - 0,461
XIII : p- CH_3 XIV : p- OCH_3 XV : p-Cl XVI : p-CN XVII : p- NO_2	- 1,236 - 1,951 - 0,483 0,950 1,350	- 1,741 - 2,250 - 0,709 1,305 1,495	0,551 0,946 0,031 - 0,305 - 0,643
s r F	1,106 0,894 1,524	1,367 0,892 1,504	0,302 0,956 4,040 ^{**}

Figuur 33 : Verband tussen berekende en experimentele hydrolysekonstanten volgens het Free en Wilson model



Daar bij de Hansch-analyse de correlerende substituentkonstanten uitsluitend elektronische invloeden weergaven is het interessant om deze de novo-substituentkonstanten van het Free en Wilson-model te vergelijken met deze elektronische substituentparameters. Volgende correlatiematrix (tabel 26) werd bekomen :

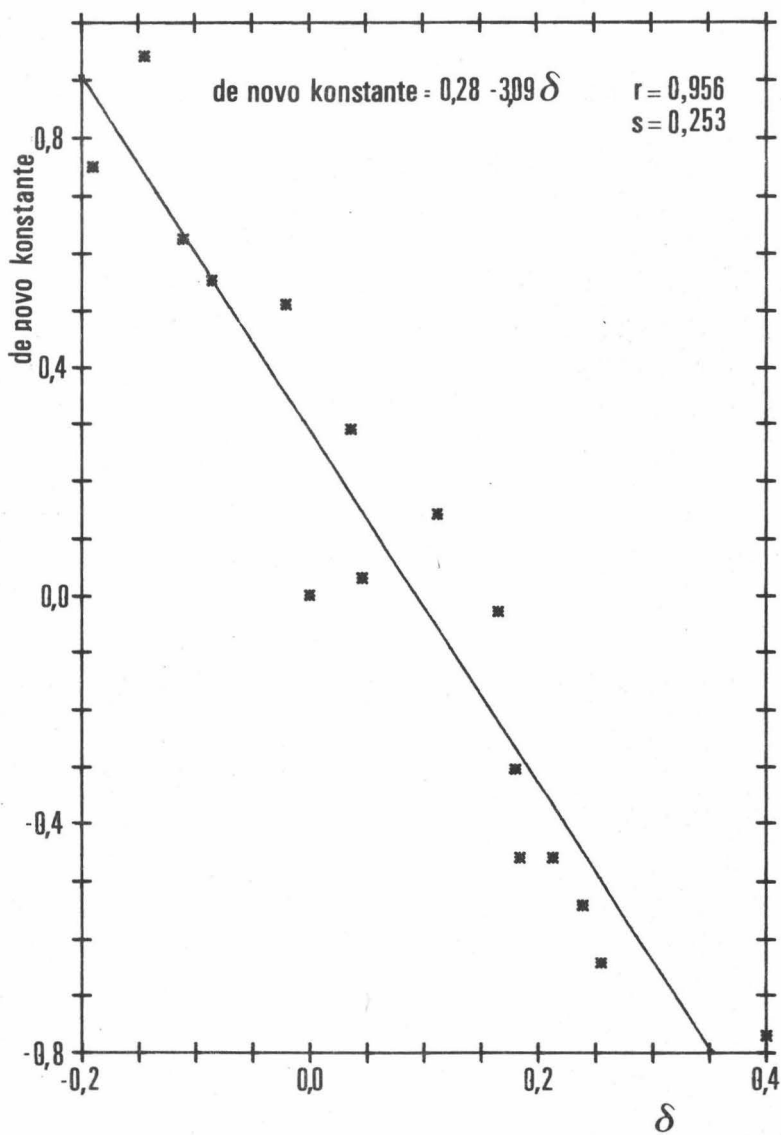
TABEL 26 : Correlatiematrix van de de novo-konstanten en de lineaire vrije energie parameters

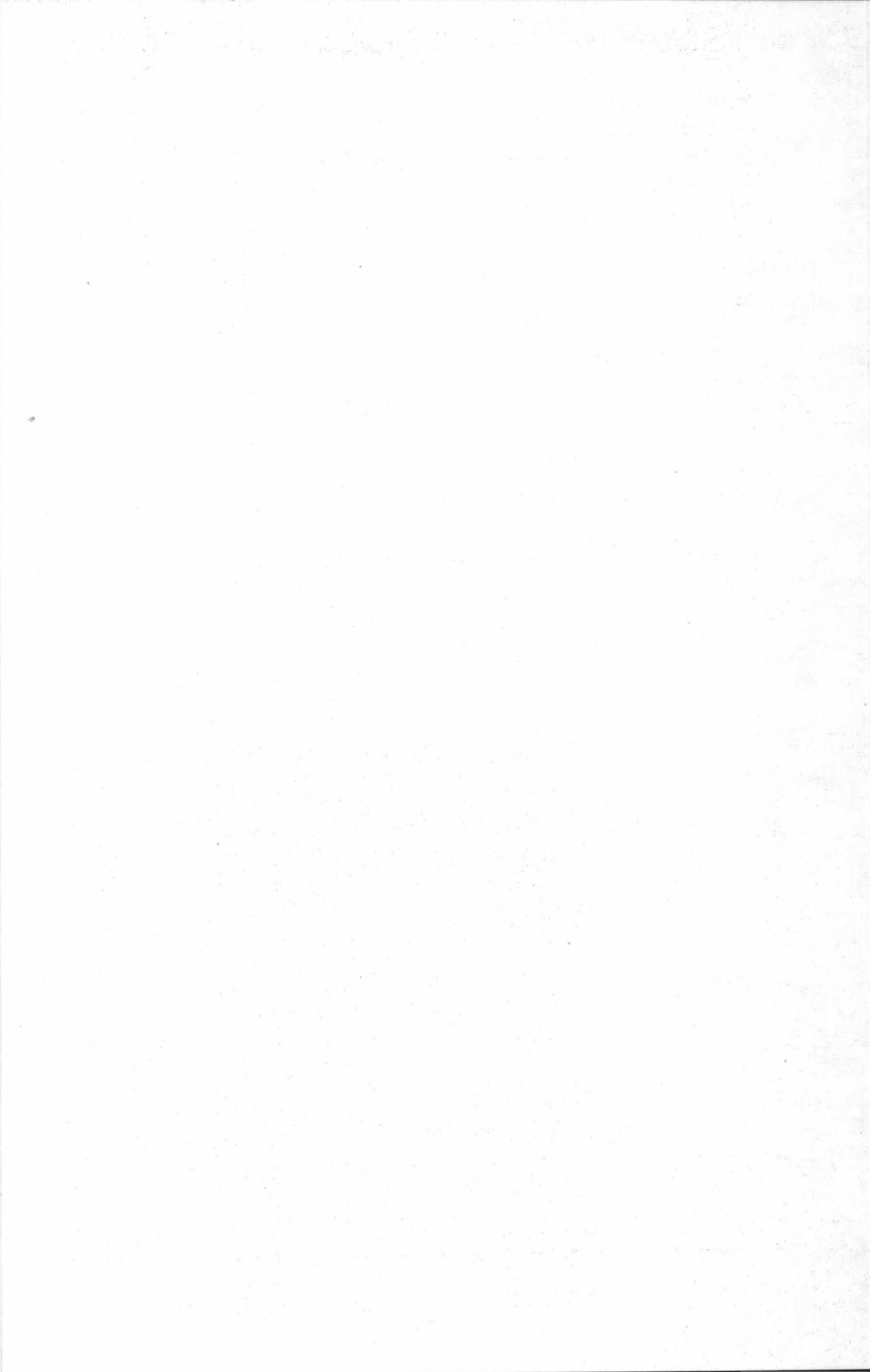
	De novo kon- stanten van <u>in</u> <u>vivo</u> -werking	De novo kon- stanten van <u>in</u> <u>vitro</u> werking	De novo kon- stanten van hydrolyse
para σ	0,933 ^{***}	0,932 ^{***}	0,931 ^{***}
\mathcal{F}	0,638	0,656	0,646
\mathcal{R}	0,943 ^{***}	0,923 ^{***}	0,919 ^{***}
$\mathcal{F} + \mathcal{R}$	0,983 ^{***}	0,972 ^{**}	0,966 ^{**}
δ	0,969 ^{***}	0,961 ^{***}	0,968 ^{***}
σ^-	0,969 ^{**}	0,915 ^{**}	0,893 ^{**}
I.R.	0,899 ^{**}	0,889 ^{**}	0,920 ^{***}
meta σ	0,871 ^{**}	0,873 ^{**}	0,859 ^{**}
δ	0,873 ^{**}	0,877 ^{**}	0,871 ^{**}
I.R.	0,782	0,792	0,716
ortho δ	0,935 ^{***}	0,943 ^{***}	0,967 ^{***}
I.R.	0,466	0,502	0,541
totaal δ	0,904 ^{***}	0,911 ^{***}	0,956 ^{***}
I.R.	0,599 ^{**}	0,613 ^{**}	0,610 ^{**}

Hieruit blijkt duidelijk dat de de novo-substituentkonstanten een grote analogie vertonen met de elektronische lineaire vrije-energiekonstanten zoals aangewend in de Hansch-analyse. Niet-tegenstaande het samenvoegen van \mathcal{R} en \mathcal{F} een betere correlatie-coëfficiënt geeft blijkt deze verbetering niet significant te zijn vergeleken met de enkelvoudige korrelatie met \mathcal{R} alleen. De r^2 -waarde wijst er op dat bij de meeste elektronische parameters de de novo-konstanten voor meer dan 90 % kunnen verklaard worden door de elektronische invloeden die deze substituenten hebben op de activiteit van de molekule, dit zowel voor de in vivo-werking, voor de in vitro-werking als voor de hydrolyse. Het verband tussen de δ -waarde en de de novo-substituent-

parameters wordt geïllustreerd in fig. 34.

Figuur 34 : Verband tussen de δ -waarden en de de novo-substitutieparameters





HOOFDSTUK III : HET QUANTUM-CHEMISCH MODEL

De structuur-aktiviteitsanalyse volgens de Hansch-methode toonde overduidelijk aan dat elektronische invloeden tussen de fosforverbinding en het AChE het belangrijkste waren. Daarom is een molekule-orbitaal-benadering van deze invloeden voor de hand liggend teneinde enerzijds deze elektronische invloeden te kunnen bepalen en anderzijds een verband te kunnen leggen tussen de toxiciteit en de elektronische eigenschappen van deze molekule. Daarom moest eerst de meest gunstige configuratie berekend worden om daarna indices te kunnen berekenen welke kunnen gecorreleerd worden met de biologische activiteit.

Deze quantum-mechanische benadering van structuur-aktiviteitsrelaties werd door Cammarata (106) omschreven als "quantum-farmacologie". Deze studietak is nog in zijn eerste ontwikkelingsstadia en zal slechts volledig tot ontwikkeling kunnen komen nadat alle praktische restricties zullen opgelost zijn. De tot nu toe gepubliceerde toepassingen van deze methode kunnen ingedeeld worden in twee groepen :

- 1° Bepalen van de beste energetische en sterische configuratie van een actieve molekule voor een bepaalde biochemische reactie.
- 2° Berekenen van indices die aangewend kunnen worden als chemische of fysische parameters om de biologische activiteit van een molekule te verklaren, zowel kwalitatief als kwantitatief.

1. PRINCIPES VAN DE MOLEKULE-ORBITAAL BEREKENINGEN

a. De Hamilton-vergelijking

De berekeningsmethodes voor de theoretische studie van multi-elektron atomen en molekulen zijn gebaseerd op kwantum-mechanische gegevens (107). Elk "steady-state"-systeem (zonder veranderingen in de tijd) kan omschreven worden door een Hamilton-vergelijking van de vorm :

$$H\Psi = E\Psi \quad (\text{vgl. 174})$$

met H als een operator (nl. de Hamiltoniaan-), de totale energie van het systeem en Ψ de golffunctie die de toestand van het systeem beschrijft.

Deze Schroedinger - golfvergelijking (vgl. 174) kan theoretisch niet bewezen worden. Het is een gepostuleerd verband dat afgeleid werd uit de logische besluiten van experimentele waarnemingen. Er zijn ook enkele overeenkomsten met de klassieke mechanica die als uitgangspunt voor de ontwikkeling van de golfvergelijking hebben gediend. In de klassieke mechanica wordt de energiewet uitgedrukt als :

$$T + V = E \quad (\text{vgl. 175})$$

met E : de totale energie

T : de kinetische energie

V : de potentiële energie

Beschouwt men een massadeeltje m dat beweegt langs een x -as in een potentieel veld met snelheid v , dan wordt vgl. 175 :

$$\frac{1}{2} mv^2 + V = E \quad (\text{vgl. 176})$$

Gebruik makend van het moment $p = mv$ wordt dit :

$$p^2/2m + V = E \quad (\text{vgl. 177})$$

Om deze vergelijking om te zetten in een golfvergelijking wordt het moment p omgezet tot een differentiële operator :

$$p \rightarrow \frac{h}{2\pi i} \frac{d}{dx}$$

met h : de Planck-konstante

$$i : \sqrt{-1}$$

$$\text{Vergelijking 177 wordt dan } -\frac{h^2}{8\pi^2 m} \frac{d^2}{dx^2} + V = E \quad (\text{vgl. 178})$$

De linkerzijde van deze vergelijking is een operator. De operand nodig voor de oplossing is Ψ , de golffunctie. Dit leidt tot een één-dimensionele Schroedinger-vergelijking in diffe-

rentiële vorm :

$$\left(-\frac{h^2}{8\pi^2 m} \cdot \frac{d^2}{dx^2} + V \right) \Psi = E\Psi \quad (\text{vgl. 179})$$

Deze Schroedinger-vergelijking kan uitgebreid worden tot een driedimensionele ruimte en de vergelijking wordt dan meestal vereenvoudigd door het linkerdeel van vgl. 179 voor te stellen als $H\Psi$, waar H een niet-gespecificeerde één-elektron Hamilton-operator is. Zo bekomt men vgl. 174.

Deze vergelijking is een typische eigenwaarde-vergelijking (108) waarvan de oplossing erin bestaat de waarden van E (eigenwaarde) en van de korresponderende Ψ -functies (eigenfuncties) te vinden die aan de vergelijking voldoen. De golfvergelijking die overeenkomt met de laagste energie beschrijft dan de basistoestand van het systeem. Voor de theoretische berekening van een fysische eigenschap van een systeem is de oplossing van de golfvergelijking vereist.

$|\Psi^2|$ stelt de probabiliteit voor van de aanwezigheid van het deeltje in een welbepaald punt van de ruimte zodat

$$\int |\Psi^2| \, dx, dy, dz = 1 \quad (\text{vgl. 180})$$

Een meer aanschouwelijke, doch enigszins onjuiste, voorstelling van de golffunctie Ψ bestaat erin het elektron te beschouwen als bewegend in een gebied van het systeem waaruit het niet kan ontsnappen. In een welbepaalde tijdspanne kan het elektron "uitgespreid" zijn over dit domein in de vorm van een "wolk". $|\Psi^2|$ geeft dan de "dichtheid" van de lading in elk punt van deze wolk.

De hamilton -vergelijking kan gemakkelijk opgesteld worden voor eender welk systeem, doch de oplossing ervan stelt problemen.

Het waterstofatoom is één van de zeldzame systemen waarvoor het mogelijk is een exacte oplossing te geven van de Hamilton-vergelijking. Voor meer complexe systemen kan een "expansiemethode" (105) angewend worden. Deze benadering is gebaseerd

op het feit dat een benaderende golfvergelijking Ψ kan bekomen worden door een "lineaire combinatie" van kleinere functies

ϕ_i ($i = 1, \dots, n$) :

$$\Psi = \sum_{i=1}^n a_i \phi_i \quad (\text{vgl. 181})$$

b. De LCAO-MO-SCF-methode

Elke molekule-orbitaal (M.O.) kan uitgedrukt worden als een lineaire combinatie van een stelsel van eenvoudiger functies X_μ ($\mu = 1, \dots, v$), gebruik makend van de expansie-methode :

$$\phi = \sum_{\mu=1}^v C_{\mu i} X_\mu \quad (\text{vgl. 182})$$

Wanneer een stelsel van atoomorbitalen (A.O.'s), waaruit een molekule is samengesteld, aangewend wordt voor X_μ dan is deze benadering een "lineaire combinatie van atoomorbitalen" (L.C. A.O.). De oplossing van dit n-elektronenprobleem bestaat erin een bestpassend stel C-coëfficiënten te vinden met behulp van het variatie-principe, dat gebaseerd is op het feit dat, voor eender welk M.O., de totale energie zo klein mogelijk moet zijn of dat

$$\frac{\delta E}{\delta C_{i,i=1,\dots,n}} = 0 \quad (\text{vgl. 183})$$

De Schroedinger vergelijking kan, na herleiding tot de vorm $(H-E)\psi = 0$ (vgl. 184), uitgebreid worden tot zijn atoomorbitalen met vgl. 182 :

$$C_a (H - E) \psi_a + C_b (H - E) \psi_b + \dots + C_n (H - E) \psi_n = 0 \quad (\text{vgl. 185})$$

Daar alleen ψ^2 enige betekenis heeft als de kans om een elektron te vinden in een bepaalde ruimte en daar de kans over de totale oppervlakte één is (vgl. 180) volgt dat vgl. 185 moet vermenigvuldigd worden door de twee golf functies van de verschillende atoomorbitalen ($\psi_a \dots \psi_n$) en geïntegreerd over de totale ruimte. Dit geeft volgende vergelijkingen :

$$(v\text{gln. } 186) \quad \begin{cases} C_a \int \Psi_a (H-E) \Psi_a d\tau + C_b \int \Psi_a (H-E) \Psi_b d\tau + \dots + C_n \int \Psi_a (H-E) \Psi_n d\tau = 0 \\ C_a \int \Psi_b (H-E) \Psi_a d\tau + C_b \int \Psi_b (H-E) \Psi_b d\tau + \dots + C_n \int \Psi_b (H-E) \Psi_n d\tau = 0 \\ C_a \int \Psi_n (H-E) \Psi_a d\tau + C_b \int \Psi_n (H-E) \Psi_b d\tau + \dots + C_n \int \Psi_n (H-E) \Psi_n d\tau = 0 \end{cases}$$

Een stel standaardnotaties werd ingevoerd ter vervanging van de integralen :

$$\begin{aligned} \alpha_i &= \int \Psi_i H \Psi_i d\tau \\ \beta_{ij} &= \int \Psi_i H \Psi_j d\tau \\ \delta_{ij} &= \int \Psi_i \Psi_j d\tau \\ E &= \int \Psi_i E \Psi_i d\tau \end{aligned}$$

De α -term wordt de Coulomb-integraal genoemd. In feite is dit een maat voor de energie nodig om een elektron te verwijderen uit zijn orbitaal. De β -term is de resonantie-integraal. Deze staat in voor de interactie-energie tussen de atoomorbitalen onderling.

De δ -term is de overlapping-integraal welke kan variëren tussen 0 en 1 naargelang de orbitalen ver van elkaar verwijderd zijn of elkaar totaal overlappen.

Met deze standaardnotaties herleid stelsel vgl. 186 zich tot :

$$(v\text{gln. } 187) \quad \begin{cases} C_a (\alpha_a - E) + C_b (\beta_{ab} - E\delta_{ab}) + \dots + C_n (\beta_{an} - E\delta_{an}) = 0 \\ C_a (\beta_{ba} - E\delta_{ba}) + C_b (\alpha_b - E) + \dots + C_n (\beta_{bn} - E\delta_{bn}) = 0 \\ \vdots \\ C_a (\beta_{na} - E\delta_{na}) + C_b (\beta_{nb} - E\delta_{nb}) + \dots + C_n (\alpha_n - E) = 0 \end{cases}$$

De oplossing van dit stelsel (vgl. 187) is volgend determinant

$$(v\text{gln. } 188) \quad \begin{vmatrix} \alpha_a - E & \beta_{ab} - E\delta_{ab} & \dots & \beta_{an} - E\delta_{an} \\ \beta_{ba} - E\delta_{ba} & \alpha_b - E & \dots & \beta_{bn} - E\delta_{bn} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \beta_{na} - E\delta_{na} & \beta_{nb} - E\delta_{nb} & \dots & \alpha_n - E \end{vmatrix} = 0$$

Deze determinant van de n^{de} graad in E geeft n -waarden van E . De laagste E -waarde geeft, na substitutie in vgl. 187, oplos-

singen voor de n C-coëfficiënten, die dan op hun beurt een oplossing geven voor vgl. 185. Het grote probleem blijft nog het vinden van de waarden voor de verschillende integraal-termen (α , β en δ), welke onmogelijk kunnen omschreven worden in exacte termen

c. Semi-empirische π -elektron methoden

Er zijn twee belangrijke benaderende M.O.-methodes ontwikkeld, nl. de Hückel-benadering en de PPP-SCF-benadering welke in een eerste fase alleen π -bindingen in rekening nemen.

- Hückel-M.O.-methode

In de Hückel-M.O.-methode (H.M.O.) (110) wordt de δ_{ij} -term gelijkgesteld aan nul als de atomen i en j verbonden zijn door een σ -binding (zero differential overlap, Z.D.O.), zodat de matrix (vgl. 188) voor bij voorbeeld benzeen herleid wordt tot :

$$\begin{vmatrix} \alpha_a - E & \beta_{ab} & 0 & 0 & 0 & \beta_{an} \\ \beta_{ba} & \alpha_b - E & \beta_{bc} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \beta_{eb} & \alpha_c - E & \beta_{ed} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \beta_{de} & \alpha_d - E & \beta_{de} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \beta_{ed} & \alpha_e - E & \beta_{ef} \\ \beta_{na} & 0 & 0 & 0 & \beta_{fe} & \alpha_f - E \end{vmatrix} = 0 \quad (\text{vgl. 189})$$

Door $\alpha - E/\beta = X$ te stellen en wegens de symmetrie van de molekule wordt deze matrix vereenvoudigd tot :

$$\begin{vmatrix} X & 1 & 0 & 0 & 0 & 1 \\ 1 & X & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & X & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & X & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & X & 1 \\ 1 & 0 & 0 & 0 & 1 & X \end{vmatrix} = 0 \quad (\text{vgl. 190})$$

De oplossing van deze determinant is een vergelijking van de

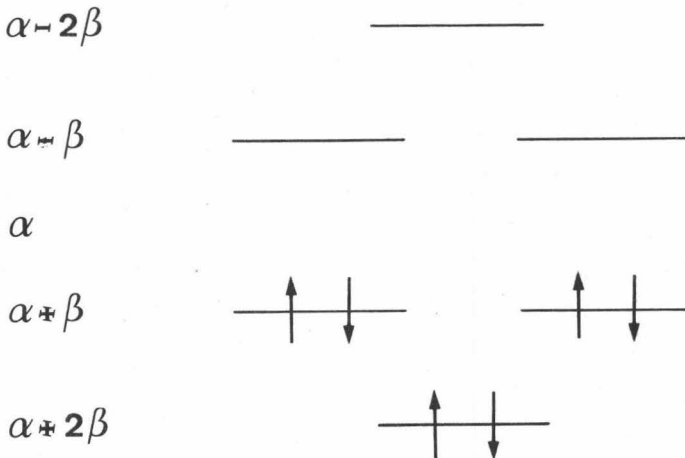
zesde graad in X : $X^6 - 6X^4 + 9X^2 - 4 = 0$

De oplossing van deze vergelijking geeft 6 wortels :

$X = 2, 1, 1, -1, -1, -2$.

De energietoestand van benzeen kan dus beschreven worden als volgt (fig. 35) :

Figuur 35 : Hückel π -elektronenergieniveau's van benzeen.



De totale energie is $2(\alpha + 2\beta) + 2(\alpha + \beta) + 2(\alpha + \beta) = 6\alpha + 8\beta$. Alleen drie orbitalen zijn bezet, de resterende drie blijven leeg (antibindingsorbitalen).

De bepaling van de coëfficiënten geeft volgende vergelijkingen voor de M.O.'s :

$E = \alpha + 2\beta$	$\Psi_I = 1/6^{1/2}$	$(\phi_a + \phi_b + \phi_c + \phi_d + \phi_e + \phi_f)$
$E = \alpha + \beta$	$\Psi_{II} = 1/12^{1/2}$	$(2\phi_a + \phi_b - \phi_c - 2\phi_d - \phi_e + \phi_f)$
$E = \alpha + \beta$	$\Psi_{III} = 1/4^{1/2}$	$(\phi_b + \phi_c - \phi_e - \phi_f)$
$E = \alpha - \beta$	$\Psi_{IV} = 1/4^{1/2}$	$(\phi_b - \phi_c + \phi_e - \phi_f)$
$E = \alpha - \beta$	$\Psi_V = 1/12^{1/2}$	$(2\phi_a - \phi_b - \phi_c + 2\phi_d - \phi_e - \phi_f)$
$E = \alpha - 2\beta$	$\Psi_{VI} = 1/6^{1/2}$	$(\phi_a - \phi_b + \phi_c - \phi_d + \phi_e - \phi_f)$

Uit het teken van de coëfficiënten kan men besluiten dat de laagste energie-M.O. (Ψ_I) de binding tussen de zes atomen aan-geeft. M.O.- Ψ_{II} geeft de binding tussen 4 paar atomen (ab, cd,

de, fa) en orbitaal Ψ_{III} geeft de binding tussen de twee resterende atoomparen (bc en ef). In Ψ_{III} zijn de coëfficiënten van ϕ_a en ϕ_d gelijk aan nul wat erop wijst dat ze gelegen zijn in "knopen" van de π -bindings-M.O.

Verschillende M.O.-indices kunnen uit de berekeningen afgeleid worden (111). Met benzeen als voorbeeld kunnen vermeld worden :

1. Delokalisatie-energie

Beschouwt men benzeen als drie aaneengeschakelde ethyleenmolekules waar geen delokalisatie van π -elektronen over de enkele bindingen gebeurt dan zou de totale π -energie gelijk zijn aan $3(2\alpha + 2\beta)$ of $6\alpha + 6\beta$. Nu is de berekende totale π -energie $6\alpha + 8\beta$, zodat de energie gewonnen door delokalisatie van het π -systeem 2β is; d.i. de delokalisatie-energie.

2. Elektronendichtheden

De probabiliteit om een elektron terug te vinden in een eenheid van volume dr wordt voorgesteld als $|\Psi|^2 dr$. In de LCAO-benadering worden de partiële golf functies ϕ_i , korresponderend met de verschillende atoomorbitalen, lineair samengevoegd volgens hun gewichtscoefficiënt C_i . De probabiliteit om een elektron in het ruimtegebied van het orbitaal ϕ_i terug te vinden is dus C_i^2 . Deze probabiliteit kan dus uitgedrukt worden als de elektronendichtheid q . Daar er steeds twee elektronen in een gevulde M.O. zitten is de elektronendichtheid op het r^{de} atoom in de i^{de} M.O.: $q_r^i = 2 C_{ir}^2$. De totale dichtheid op atoom r is dan de som van de elektronendichtheden op atoom r voor alle bezette M.O.'s :

$$q_r = \sum_{i \text{ occ.}} 2 C_{ir}^2$$

Voor benzeen zijn er drie bezette M.O.'s: Ψ_I , Ψ_{II} , Ψ_{III} . De π -elektronendichtheid voor het eerste koolstofatoom a is bvb.:

$$q_a = 2 (1/6^{1/2})^2 + 2 (2/12^{1/2})^2 + 2 (0)^2 = 1$$

$$q_b = 2 (1/6^{1/2})^2 + 2 (1/12^{1/2})^2 + 2 (1/4^{1/2})^2 = 1$$

Aanloog is $q_c = q_d = q_e = q_f = 1$, wat erop wijst dat de elektronendichtheid op alle atomen gelijk is. In gesubstitueerde benzenen kan er echter een zeer ongelijke π -elektronendichtheid optreden, te wijten aan de elektronenaantrekkende of -afstotende substituenten.

3. Netto-lading

Door de elektronendichtheid af te trekken van het aantal elektronen dat aan het π -systeem van dit atoom deelneemt bekomt men de netto-lading. Bij benzeen is dus $1 - 1 = 0$, wat erop wijst dat geen enkele koolstofatoom een preferentiële lading heeft.

4. Bindingsorde

De bindingsorde van een M.O. tussen de atomen r en s wordt gedefinieerd als :

$$p_{rs}^i = C_{ir} C_{is}$$

De bindingsorde tussen twee atomen is dan het resultaat van de bijdrage van elke bezette M.O. :

$$p_{rs} = \sum_{i \text{ occ}} 2 C_{ir} C_{is}$$

Deze waarde staat nauw in verband met de bindende kracht van een π -binding. Nabijgelegen atomen met grote C-coëfficiënten van hetzelfde teken zijn sterk π -gebonden. De berekening van de p_{rs} -waarden voor benzeen geeft :

$$p_{ab} = 2 \left(\frac{1}{6} \right)^{1/2} \cdot \left(\frac{1}{6} \right)^{1/2} + 2 \left(\frac{2}{12} \right)^{1/2} \cdot \left(\frac{1}{12} \right)^{1/2} + 2 (0) \left(\frac{1}{4} \right)^{1/2} = 2/3$$

$$p_{bc} = 2 \left(\frac{1}{6} \right)^{1/2} \cdot \left(\frac{1}{6} \right)^{1/2} + 2 \left(\frac{1}{12} \right)^{1/2} \cdot \left(-\frac{1}{12} \right)^{1/2} + 2 \left(\frac{1}{4} \right)^{1/2} \cdot \left(\frac{1}{4} \right)^{1/2} = 2/3$$

Aanloog is $p_{cd} = p_{de} = p_{ef} = p_{fa} = 2/3$.

Het blijkt terug dat voor benzeen alle π -bindingen van dezelfde sterkte zijn. Men kan ook, als een andere wijze voor de interpretatie van de bindingsorde, aan een enkele binding de waarde 1 geven, aan een dubbele binding de waarde 2 en een driedubbele

3. De benzeenbindingen hebben een π -bindingsorde van 0,66, vermeerderd met 1 voor de σ -binding, zodanig dat de totale bindingsorde 1,66 bedraagt. Dit wijst erop dat de benzeenbindingen voor $2/3$ op een dubbele binding gelijken.

- De P.P.P.-S.C.F.-methode

Terwijl in de HMO-methode alle elektronische afstotingen genegeerd worden stelde Pariser, Parr(112) en Pople (113) een methode voor uitgaande van de π -elektron-uitdrukking :

$$H = \sum_i H^{\text{kern}} + \frac{1}{2} \sum \frac{e^2}{r_{ij}} \quad (\text{vgl. 191})$$

De eerste term beschrijft de aantrekkingsenergie van de kern voor de π -elektronen; de tweede term is de elektronenafstoting tussen de π -elektronen onderling. Elke e^2/r_{ij} -term omvat de coördinaten van twee elektronen tegelijkertijd en kan dus niet direkt bepaald worden. Deze term kan echter wel benaderd worden door bijv. elektron 1 te beschouwen in het gemiddeld veld van een ander elektron 2. Dit gemiddeld veld is

$$\int \Psi_{(2)}^2 \frac{e^2}{r_{12}} d\tau_2 \quad (\text{vgl. 192})$$

Elektronenuitwisseling tussen M.O.'s μ en ν wordt ingelast door de term

$$\int \Psi_{\mu}(2) \Psi_{\nu} \frac{e^2}{r_{12}} d\tau_2 \quad (\text{vgl. 193})$$

Een uitgebreide golfvergelijking kan also opgesteld worden als :

$$\left(\sum H^{\text{kern}} + 2 \sum \int \Psi_{\nu}^2(2) \frac{e^2}{r_{12}} d\tau_2 \right) \Psi_{\mu}(1) - \sum_{\nu} \left(\Psi_{\nu}(2) \Psi_{\mu}(2) \frac{e^2}{r_{12}} d\tau_2 \right) \Psi_{\nu}(1) = E_{\mu} \Psi_{\mu} \quad (\text{vgl. 194})$$

Door de gemiddelde veld-term te vervangen door J en de uitwisselingsterm door K bekomt men

$$\left[\sum H^{\text{kern}} + \sum (2 J_{\nu} - K_{\nu}) \right] \Psi_{\mu}(1) = E_{\mu} \Psi_{\mu}(1) \quad (\text{vgl. 195})$$

Deze funktie is van de vorm $F\Psi_\mu = E\Psi_\mu$ of $(F - E)\Psi_\mu = 0$ (vgl. 196)
 Zoals bij de HMO-methode wordt het LCAO-principe toegepast en
 volgens het variatie-theorema bekomt men een stel analoge ver-
 gelijkingen :

$$\sum_k C_{k\mu} \int \phi_l F \phi_k d\tau = E_\mu \sum_k C_{k\mu} \int \phi_l \phi_k d\tau \quad (\text{vgl. 197})$$

(k en l geven de atoomorbitalen)

$$\begin{aligned} \text{Zoals bij de HMO-methode wordt : } \int \phi_k F \phi_k d\tau &= F_{kk} = \alpha_k \\ \int \phi_k F \phi_l d\tau &= F_{kl} = \beta_{kl} \\ \int \phi_k \phi_l d\tau &= \delta_{kl} \end{aligned}$$

De α - en β -termen gelijken op deze in de HMO-methode, doch ze
 bevatten ook de coördinaten van de elektronen. De C-coëffici-
 ciënten worden dan bepaald door een analoge oplossing van de
 determinant :

$$\begin{vmatrix} \alpha_{aa} - E & \beta_{ab} - E\delta_{ab} & \beta_{ac} - E\delta_{ac} & \dots & \beta_{an} - E\delta_{an} \\ \beta_{ba} - E\delta_{ba} & \alpha_{bb} - E & \beta_{bc} - E\delta_{bc} & \dots & \beta_{bn} - E\delta_{bn} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \beta_{na} - E\delta_{na} & \beta_{nb} - E\delta_{nb} & \beta_{nc} - E\delta_{nc} & \dots & \alpha_{nn} - E \end{vmatrix} = 0$$

De oplossing van deze determinant kan benaderend herleid wor-
 den tot de volgende vergelijkingen :

$$\alpha_k = \alpha_k^{\text{kern}} + \frac{1}{2} q_k (kk/kk) + \sum_l q_l (kk/ll) \quad (\text{vgl. 198})$$

$$\beta_{kl} = \beta_{kl}^{\text{kern}} + \frac{1}{2} p_{kl} (kl/ll) \quad (\text{vgl. 199})$$

- met q_k : de totale π -elektronendichtheid op atoom k
 α_k^{kern} : de waarde van het één elektron-gedeelte van de
 Hamiltonian geïntegreerd over één kern (α_k)
 β_{kl}^{kern} : de waarde van het één elektron-gedeelte van de
 Hamiltonian geïntegreerd over twee kernen (β_{kl})
 (kk/kk) : de integraal welke de afstoting tussen twee elek-
 tronen in het veld van dezelfde kern omschrijft
 (kl/ll) : de integraal die de afstoting tussen twee elek-
 tronen van nabije kernen k en l omschrijft.

Aan de hand van deze vergelijkingen voor de α - en β -waarden kan de determinant opgelost worden voor de coëfficiënten en vervolgens voor de waarden p en q. Deze nieuwe p- en q-waarden worden aangewend om een verbeterd stelsel α - en β -waarden te berekenen en het hele proces wordt herhaald tot de uiteindelijke α - en β -waarden niet meer veranderen binnen vooropgestelde limieten. Deze berekeningstechniek, gekend onder de *self-consistent field*, (S.C.F.)-procedure kan best uitgevoerd worden met de beschikbare computerprogramma's (114). Als input dient men eerst een stel benaderende α -, β -, (kk/kk)- en (kk/ll)-waarden te geven die empirisch werden afgeleid (115).

d. Totaal-valentie M.O.-methodes

De twee π -elektron-methodes (HMO en PPP-SCF) zijn uitgebreid tot $(\pi + \sigma)$ -methodes. Hoffmann (116) stelde een LCAO-methode voor, gekend als de "extended Hückel theorie" (E.H.T.) welke een uitbreiding is van de HMO-methode. Pople (117) beschreef een methode gebaseerd op het SCF-principe, gekend als de CNDO/2-techniek (complete neglect of differential overlap).

Na een ganse reeks benaderingen en eliminaties bekomt men uiteindelijk een F-matrix met volgende elementen :

$$F_{ii} = -\frac{1}{2} (I_i + A_i) + \left[(P_{aa} - Z_a) - \frac{1}{2} (P_{ii} - 1) \right] (aa/aa) + \sum (P_{bb} - Z_b) (aa/bb) \quad (\text{vgl. 199})$$

$$F_{ij} = \beta_{ij}^0 \delta_{ij} - \frac{1}{2} P_{ij} (aa/bb) \quad (\text{vgl. 200})$$

Deze vergelijkingen zijn slechts een uitbreiding van de α en β termen in de PPP-SCF-methode (vgl. 198 en 199):

I : de ionisatiepotentiaal

A : de elektronenaffiniteit van het elektron in zijn valentiestaat.

a en b slaat op atoom a, rep. b, i en j orbitaal i en j

β^0 wordt berekend op kleine molekulen :

$$\beta_{ij} = \delta_{ij} (\beta_a^0 + \beta_b^0) / 2$$

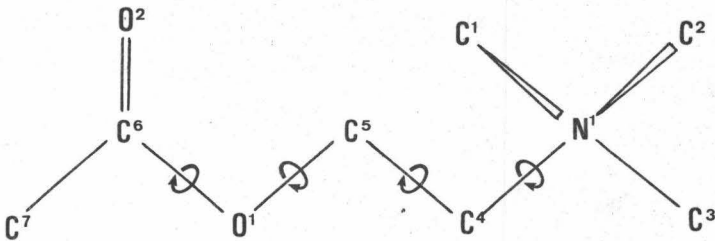
De oplossing van dit probleem gebeurt analoog als bij de PPP-SCF-methode. Het is duidelijk dat deze berekeningen enorm tijdrovend

zijn en slechts uitvoerbaar zijn met een sterke reken-eenheid. Voor CNDO/2 zijn standaardprogramma's beschikbaar (118).

2. DE STRUKTUUR VAN ACETYLCHOLINE

Het probleem van de reactie tussen AChE en acetylcholine (ACh) wordt niet vergemakkelijkt door het feit dat de acetylcholine-molekule geen starre structuur heeft doch verschillende vrije roterende bindingen die een grote invloed hebben op de inter-atomaire afstanden tussen de funktionele groepen (fig. 36).

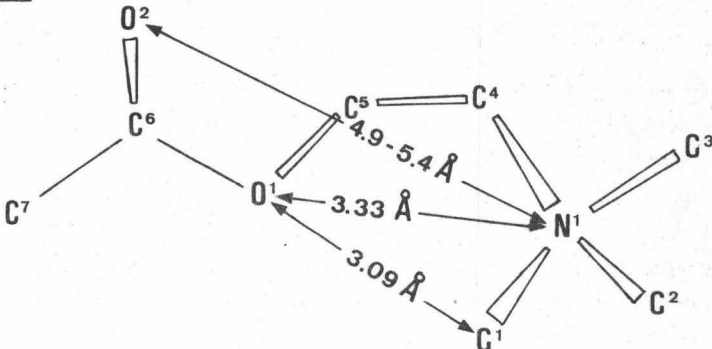
Figuur 36 : Roterende bindingen in de acetylcholine-molekule



De vier aangeduide hoeken beïnvloeden sterk de afstand tussen bvb. O_1 en C_1 of tussen O_1 en N_1 . Om de beste konformatie van ACh te berekenen is het noodzakelijk de funktionele groepen een vaste structuur te geven en vervolgens de vrij roterende bindingen te laten variëren tot een, energetisch beschouwd, beste structuur bekomen is (119).

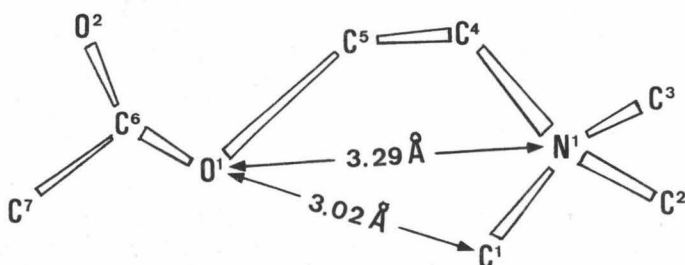
De berekende ideale structuren van ACh is voorgesteld in fig. 37.

Figuur 37 : Berekende konfiguratie van acetylcholine



De afstanden N_1-O_1 , C_1-O_1 en N_1-O_2 zijn resp. 3,33 Å, 3,09 Å en 4,9 - 5,4 Å (wegens de vrije rotatie van de C_1-O_1 binding). De bekomen resultaten kunnen vergeleken worden met de experimentele structuurbepaling in kristalvorm d.m.v. X-stralenanalyse (120). Toch moet steeds in gedachte gehouden worden dat deze X-stralenanalyse gebeurt op kristallen waarin de konformatie verschillend kan zijn met bvb. in biologisch milieu. Niettemin kan de analogie tussen de resultaten van beide methoden een goede aanduiding geven van de stereokonfiguratie. De acetylcholine-molekule in kristallen heeft volgende structuur, zoals bepaald door X-stralen-analyse (120) (fig. 38) :

Figuur 38 : Kristalstructuur van acetylcholine volgens X-stralenanalyse



De afstanden N_1-O_1 en C_1-O_1 zijn resp. 3,29 Å en 3,02 Å. Rekening houdend met de experimentele fout van de meting zijn deze interatomaire afstanden identiek met de berekende waarden.

3. STRUKTUUR VAN DE O-ALKYL-O-ARYL FENYLFOSFONATEN

Voor een goede verklaring van het inhibitiemechanisme van organofosforverbindingen op AChE is het nodig dat men een uitgebreide drie-dimensionale structurele informatie heeft over zowel de actieve plaatsen van het enzyme als van de organofosformolekulen. Omdat de fosforylatie van AChE voor een groot deel gebeurt analoog qua ladingen, grootte en ruimtelijke structuur als de reactie met het natuurlijk substraat, het acetylcholine.

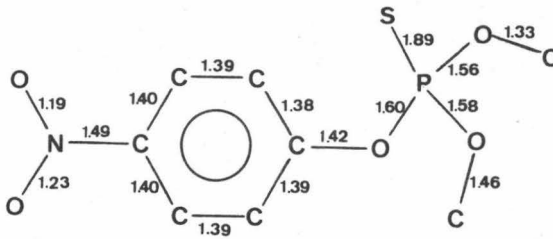
De fosfaat-estergroep komt dan overeen met de acetylgroep en een deel van de X-groep van $RR'P(O)X$ correspondeert met de kwaternaire cholinestikstof. Volgens het AChE-model van Krupka (55) reageert de estergroep met een serine-hydroxylgroep en de X-groep wordt gebonden aan een anionische plaats. Zoals eerder aangetoond (Deel II, Hoofdstuk III) is de AChE-inhibitie door fosfonaten vooral afhankelijk van elektronische invloeden. Om de aard van deze elektronische factoren beter te kennen is een drie-dimensionale visualisatie misschien de sleutel tot het begrijpen van de inhibitiereducties.

De enige informatie in de literatuur beschikbaar over de structuur van organofosforverbindingen is een X-stralen-diffractie-analyse van Bally (121) handelend over de structuur van methylparathion. Zeer recent (1975) verscheen een analoge studie van Baughman en Jacob (129) over de structuur van fenchloorfos. Aan de hand van deze informatie en van de algemeen gekende interatomaire afstanden en hoeken werd een hypothetische structuur opgesteld. Deze is afgebeeld in fig. 39c voor de interatomaire afstanden en fig. 40c voor de hoeken. Als centrum voor het XYZ-coördinatenstelsel werd het koolstofatoom van de $POC_{arom.}$ -binding genomen (C_1). De specifieke interatomaire afstanden en hoeken werden overgenomen van de resultaten van Bally. Daar de structuuranalyse van fenchloorfos op het tijdstip van de berekeningen nog niet bekend waren kon daarmee geen rekening gehouden worden doch de analogie tussen beide studies zoals afgebeeld in resp. fig. 39a en fig. 40a voor methylparathion en fig. 39b en fig. 40b voor fenchloorfos is opvallend.

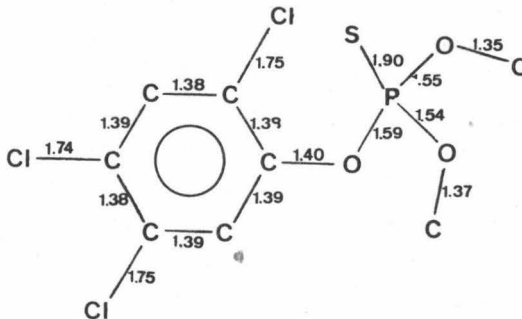
Aan de hand van deze hoeken en interatomaire afstanden werden de cartesische coördinaten berekend. Een Fortran IV-programma werd opgesteld om deze berekeningen mogelijk te maken. De input (aatomsekwentie, afstanden en hoeken) en output van dergelijke berekening is afgebeeld in tabel 27. Met deze cartesische coördinaten kan men de ruimtelijke structuur van de molekulen berekenen. Fig. 41 toont de hypothetische ruimtelijke configuratie van de ongesubstitueerde molekulen 4a overeenkomstig de gegevens van tabel 27. Voor de biologische activiteit is vooral het linker- en centraal gedeelte van de molekulen belangrijk omdat deze moeten korresponderen met resp. de anionische en de

Figuur 39 : Interatomaire afstanden van organische fosformolek-
kelen

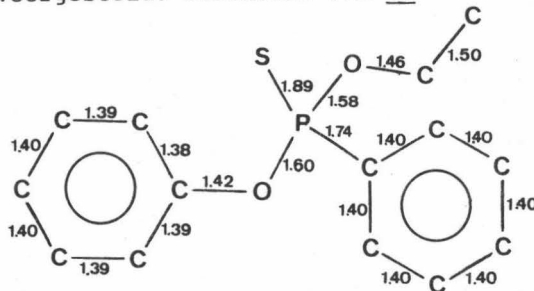
a : Methylparathion (121) met X-stralenanalyse.



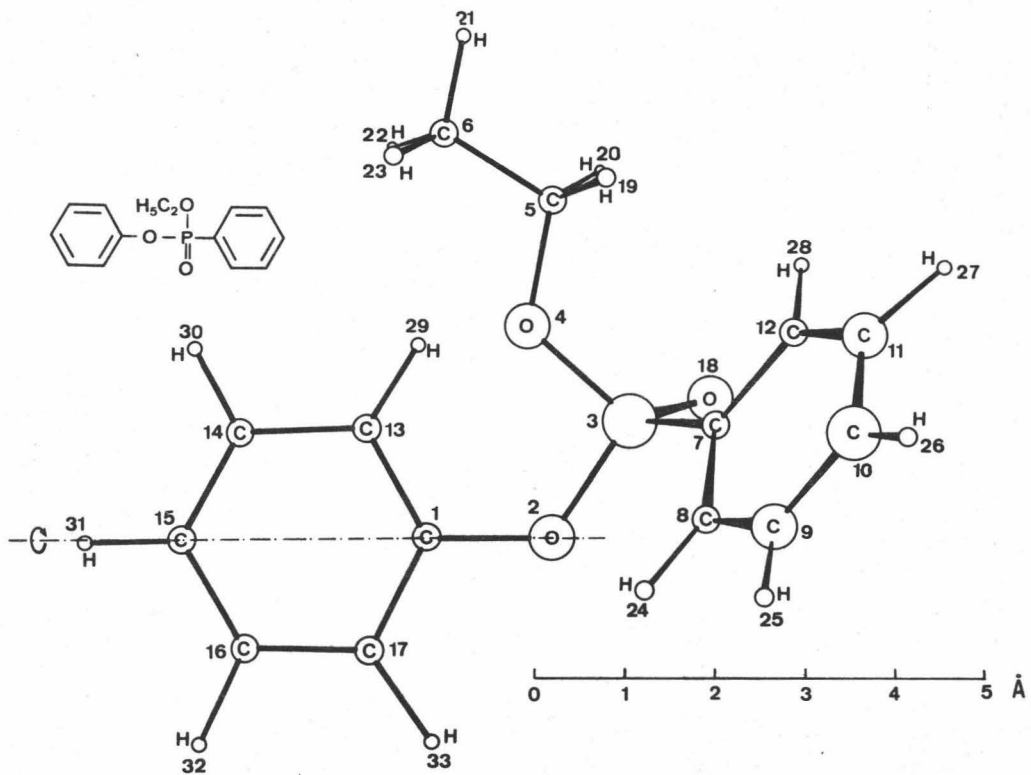
b : Fenchloorfos (122) met X-stralenanalyse.



c : Voorgestelde structuur van 4a



Figuur 41 : Hypothetische ruimtelijke configuratie van 4a.



TABEL 27 : Omrekening van polaire naar cartesische coördinaten voor 4a

Volg- orde	Atoom- nummer	Sekwentie				Interatomaire afstand	Hoek a-b-c	hoek (ab) - (cd)	Coördinaten		
		a	b	c	d				X	Y	Z
1	6	1	0	0	0	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,000
2	8	2	1	0	0	1,420	0,0	0,0	1,420	0,000	0,000
3	15	3	2	1	0	1,600	123,0	0,0	2,291	1,342	0,000
4	8	4	3	2	1	1,580	100,0	0,0	1,136	2,419	0,000
5	6	5	4	3	2	1,460	121,0	180,0	1,439	3,848	0,000
6	6	6	5	4	3	1,500	109,5	180,0	0,160	4,631	0,000
7	6	7	3	2	1	1,740	106,0	- 120,0	3,254	1,289	1,449
8	6	8	6	3	2	1,396	120,0	0,0	3,147	0,202	2,318
9	6	9	8	7	3	1,396	120,0	180,0	3,919	0,159	3,480
10	6	10	9	8	7	1,396	120,0	0,0	4,799	1,203	3,773
11	6	11	10	9	8	1,396	120,0	0,0	4,906	2,290	2,903
12	6	12	7	3	2	1,396	120,0	180,0	4,133	2,333	1,741
13	6	13	1	2	3	1,380	119,0	0,0	- 0,669	1,207	0,000
14	6	14	13	1	2	1,390	118,0	180,0	- 2,059	1,183	0,000
15	6	15	14	13	1	1,400	118,0	0,0	- 2,694	- 0,065	0,000
16	6	16	15	14	13	1,400	123,0	0,0	- 1,994	- 0,277	0,000
17	6	17	16	15	14	1,390	119,0	0,0	- 0,605	- 1,253	0,000
18	1	18	3	2	1	1,890	116,0	120,0	3,455	1,574	- 1,471
19	1	19	5	4	3	1,100	109,5	- 60,0	2,023	4,099	- 0,898
20	1	20	5	4	3	1,100	109,5	60,0	2,023	4,099	0,898
21	1	21	6	5	4	1,100	109,5	180,0	0,389	5,707	0,000
22	1	22	6	5	4	1,100	109,5	60,0	- 0,424	4,381	- 0,898
23	1	23	6	5	4	1,100	109,5	- 60,0	- 0,424	4,381	0,898
24	1	24	8	9	10	1,100	120,0	180,0	2,454	- 0,621	2,088
25	1	25	9	10	11	1,100	120,0	180,0	3,835	- 0,697	4,166
26	1	26	10	11	12	1,100	120,0	180,0	5,407	1,170	4,689
27	1	27	11	12	7	1,100	120,0	180,0	5,599	3,113	3,134
28	1	28	12	11	10	1,100	120,0	180,0	4,218	3,189	1,056
29	1	29	13	14	15	1,100	121,0	180,0	- 0,119	2,160	0,000
30	1	30	14	15	16	1,100	121,0	180,0	- 2,642	2,116	0,000
31	1	31	15	16	17	1,100	118,5	180,0	- 3,794	- 0,093	0,000
32	1	32	16	15	14	1,100	120,5	180,0	- 3,794	- 0,093	0,000
33	1	33	17	15	14	1,100	121,5	180,0	- 0,569	- 2,352	0,000

esterase-bindingsplaatsen van het AChE, of nog precieser met de kwaternaire cholinestikstof en met de acetylgroep van het AChE.

Het linker-gedeelte van de molekule zoals in fig. 41 heeft echter een mogelijkheid tot vrije rotatie van de arylgroep rond de C_1-O_2 as. Hierdoor varieert de sterische hindering tussen het O_4 -atoom en de C_{13} -H-plaats. Een hoek van 0° of van 180° (de C_{17} -H neemt dan de plaats in van de C_{13} -H) geeft aanleiding tot een zeer grote sterische hindering terwijl daartussen deze hindering ergens minimaal moet zijn. De beste ruimtelijke konfiguratie komt overeen met deze waarvan de rotatiehoek de gunstigste totaalenergie geeft. Deze totaalenergie werd berekend bij verschillende opgelegde rotatiehoeken en volgende waarden werden bekomen:

hoek θ	totaalenergie (A.U.)	Δ totaalenergie (A.U.)
0°	- 165,8971	0,0000
30°	- 165,9769	0,0798
45°	- 165,9823	0,0852
60°	- 165,9829	0,0858
75°	- 165,9825	0,0855
90°	- 165,9825	0,0854
120°	- 165,9828	0,0857
150°	- 165,9731	0,0760

De energie wordt berekend als atomaire eenheden (A.U.); 1 A.U. komt overeen met 27,204 eV en 1 eV is 23 Kcal zodat 1 A.U. = $27,204 \times 23$ Kcal/mol). Deze gegevens zijn grafisch voorgesteld in fig. 42. Het energiemaximum is gelegen tussen 45° en 60° . Door het energieverloop tussen 0° en 60° te beschouwen als een parabool kan men de volgende vergelijking aan deze curve toeschrijven :

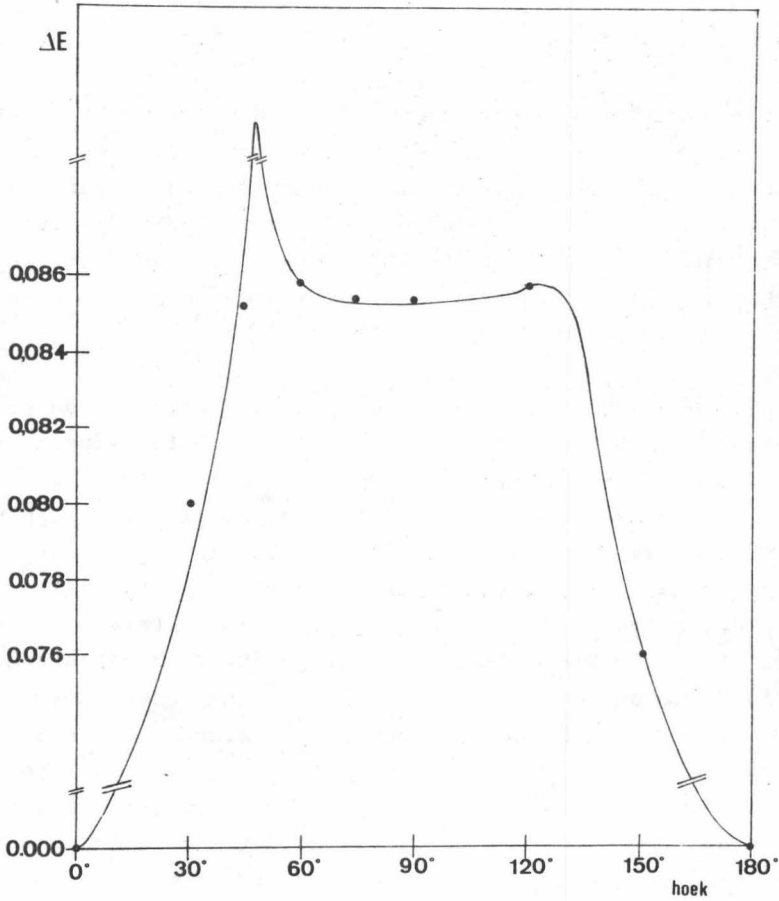
$$\Delta E = 0,003689 \theta - 0,000038 \theta^2 + 0,000592 \quad (\text{vgl. 201})$$

met $s = 0,005$

$r = 0,997$

$F = 97,57^{**}$

Figuur 42 : Verband tussen rotatiehoek van de benzeenring rond de C_1-O_2 -as en de totaalenergie.



De hoek overeenkomstig met de maximale energie kan hieruit bekomen worden :

$$\frac{dE}{d\theta} = 0,003689 - 0,000076 \theta$$

$$\theta_{\max} = \frac{0,003689}{0,000076} = 48,55 \quad (\text{vgl. 202})$$

Deze hoek van 48° tussen de benzeenring en het $C_1-O_2-P_3$ vlak werd behouden voor alle verdere berekeningen. De meest waarschijnlijke structuur voor de niet-gesubstitueerde molekulen 4a is voorgesteld in fig. 43. In de studie van Baughman (122) werd voor fenchloorfos een hoek van 70° bepaald. Dit verschil is waarschijnlijk te wijten aan de grotere sterische hindering van het ortho-chlooratoom in deze molekulen.

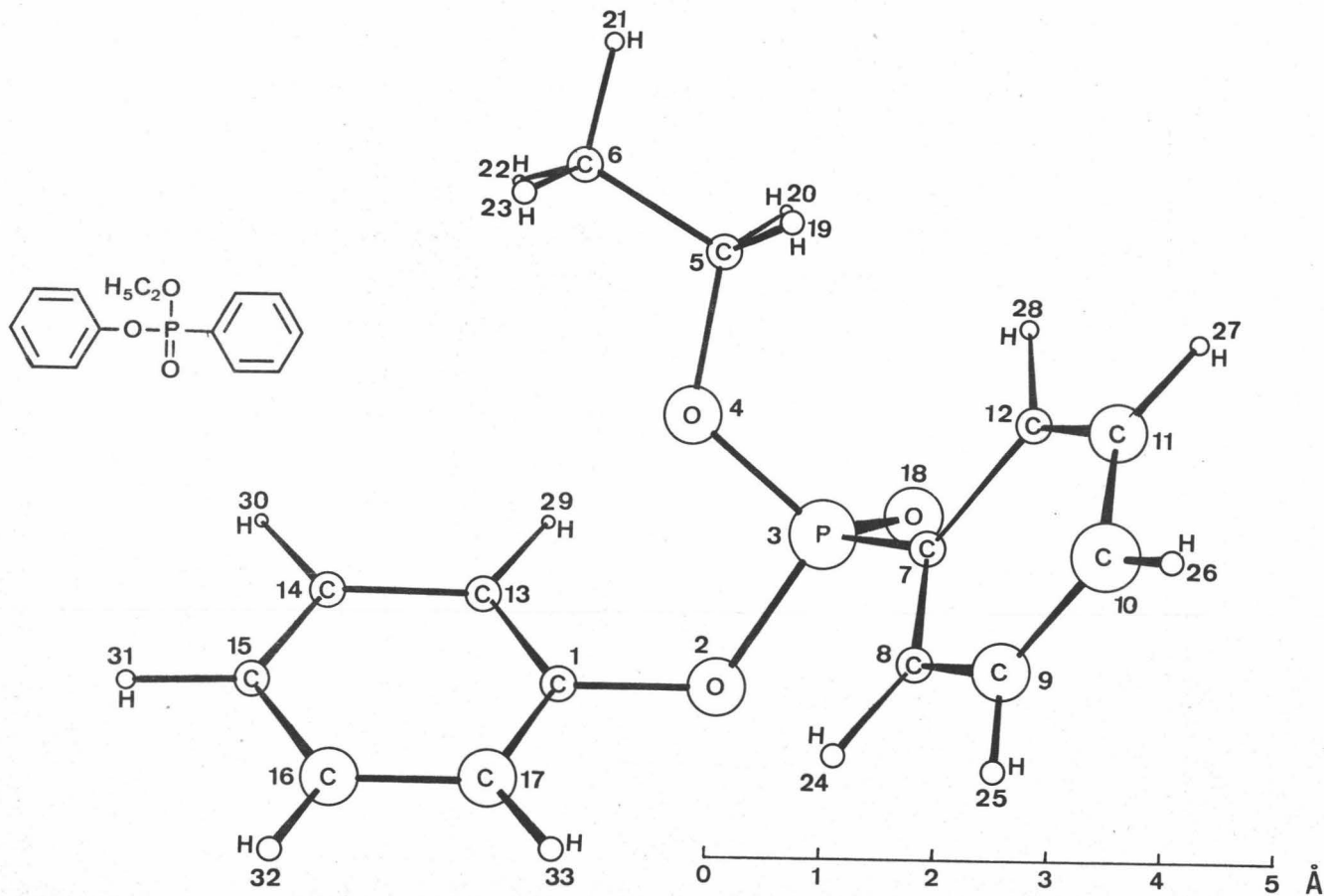
Een reeks CNDO/2-berekeningen werden met de voorgestelde hoeken en afstanden uitgevoerd voor de O-alkyl-P-aryl fenylfosfonothioaten. Enkele bijkomende gegevens voor de verschillende substituenten werden overgenomen uit de literatuur (123) en zijn vermeld in tabel 28. Deze waarden zijn ook toepasselijk voor de ortho- en meta-substitutie. De ortho-substitutie kan alleen maar op C_{17} gebeuren daar op de C_{13} -positie de sterische hindering met de P-O-alkylgroep te groot wordt. Voor de meta-substitutie is er op het eerste zich geen uitgesproken voorkeur voor C_{14} of C_{16} . De berekening van de totaalenergie van de meta-cyano substitutie resp. op C_{14} en C_{16} gaf een energiever- schil van 0,000076 A.U. of 47 cal/mol zodat een geringe voor- keur bestaat voor de C_{14} -substitutie en dat deze C_{14} -substitu- tie behouden werd voor alle andere substituenten :

totaalenergie van m-cyano op C_{14} : - 190,721415 A.U.

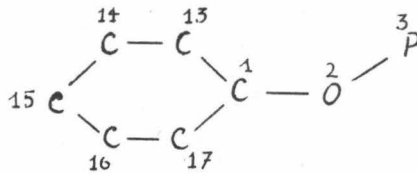
totaalenergie van m-cyano op C_{16} : - 190,721339 A.U.

totaalenergieverschil 0,000076 A.U.

Figuur 43 : De beste configuratie van 4a.



TABEL 28 : Aanvullende interatomaire afstanden en hoeken



Nr.	Subst.	sekwentie	Afstand	hoek a-b-c	hoek ab - cd
		a b c d			
4d	4-CH ₃ ↓ ↓ ↓ AB	C _A -C ₁₅ -C ₁₄ -C ₁₃	1,505	118,50	180,00
		H _B -C _A -C ₁₅ -C ₁₄	1,100	109,50	180,00
	C	H _C -C _A -C ₁₅ -C ₁₄	1,100	109,50	60,00
	D	H _D -C _A -C ₁₅ -C ₁₄	1,100	109,50	- 60,00
4g	4-OCH ₃ ↓ ↓ ↓ ABC	O _A -C ₁₅ -C ₁₄ -C ₁₃	1,360	118,50	180,00
		C _B -O _A -C ₁₅ -C ₁₄	1,426	121,00	180,00
	D	H _C -C _B -O _A -C ₁₅	1,100	109,50	180,00
	E	H _D -C _D -O _A -C ₁₅	1,100	109,50	180,00
		H _E -C _B -O _A -C ₁₅	1,100	109,50	180,00
4j	4-Cl	Cl-C ₁₅ -C ₁₄ -C ₁₃	1,700	118,50	180,00
4m	4-CN ↓ ↓ AB	C _A -C ₁₅ -C ₁₄ -C ₁₃	1,464	118,50	180,00
		N _A -C _A -C ₁₅ -C ₁₄	1,157	180,00	0,00
4p	4-NO ₂ ↓ ↓ AB	N _A -C ₁₅ -C ₁₄ -C ₁₃	1,490	118,50	180,00
		O _B -N _A -C ₁₅ -C ₁₄	1,230	115,00	180,00
	C	O _C -N _A -C ₁₅ -C ₁₄	1,190	118,00	0,00
4q	4-F	F-C ₁₅ -C ₁₄ -C ₁₃	1,330	118,50	180,00
4t	4-CH ₂ CH ₃ ↓ ↓ ↓ ↓ AC B E	C _A -C ₁₅ -C ₁₄ -C ₁₃	1,505	118,50	180,00
		C _B -C _A -C ₁₅ -C ₁₄	1,537	109,50	180,00
		H _C -C _A -C ₁₅ -C ₁₄	1,10	109,50	60,00
	D F	H _D -C _A -C ₁₅ -C ₁₄	1,10	109,00	- 60,00
	G	H _E -C _B -C _A -C ₁₅	1,10	109,50	180,00
		H _F -C _B -C _A -C ₁₅	1,10	109,50	180,00
		H _G -C _B -C _A -C ₁₅	1,10	109,50	- 60,00

4. M.O.-INDICES EN KORRELATIE MET DE BIOLOGISCHE AKTIVITEIT

CNDO/2-berekeningen werden uitgevoerd op een beperkte reeks O-alkyl-O-aryl fenylfosfonaten (zie tabel 29). Als output bekomt men o.a. de totaalenergie, de bindingsenergie, het dipoolmoment, de HOMO- en LEMO-waarden en de lading op elk atoom van de molekule. Interessanter dan deze lading van elk atoom is de netto lading van deze atomen, d.w.z. het verschil tussen de lading van de atoomkern ontdaan van zijn valentie-elektronen en de berekende lading van het atoom in de molekule. Zo is bv. de netto lading van een koolstofatoom met 3,9365 als berekende lading 0,0635 zijnde het verschil tussen 4,0 en 3,9365. Van een zuurstofatoom met 6,4388 als lading is de netto lading 6,0 - 6,4388 = - 0,4388.

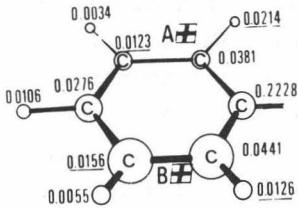
In tabel 29 zijn de belangrijkste gegevens samengebracht. Vooral de netto-ladingen op het fosforatoom en op de fenoxylring zijn van belang voor de verklaring van de biologische werking. Duidelijk blijkt dat de positieve of negatieve lading op elk atoom beïnvloed wordt door de substituenten, de substitutieplaats en de positieve lading van het fosforatoom. Opvallend is ook dat de positieve ladingen zich bevinden aan weerszijden van de arylring. In het verdere verloop worden deze beide positieve "wolken" \oplus A en \oplus B genoemd voor resp. de bovenzijde en de onderzijde van de fenylring zoals afgebeeld in fig. 44. De lading ervan werd berekend en het centrum gelokaliseerd door een eenvoudige vektorberekening.

De grootte van deze lading (bekomen door samentellen der positieve atoomladingen) zou in verband kunnen staan met de affiniteitskonstante K_a van de reactie tussen de organofosforverbinding en het AChE, en dan vooral dat deel van de complexatie waar de anionische plaats van het enzyme bij betrokken is. Correlatie van deze \oplus -lading met de biologische activiteit in vitro gaf volgende vergelijkingen :

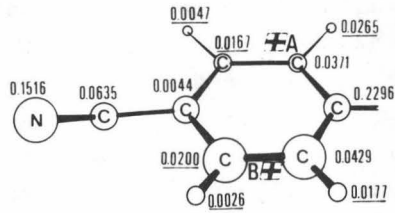
$pI_{50} = -1,276 + 4,405$	\oplus A	$\frac{n}{8}$	$\frac{s}{1,40}$	$\frac{r}{0,60}$	$\frac{F}{3,38}$	(vgl. 203)
$2,024 + 3,377$	\oplus B	8	1,51	0,51	2,10	(vgl. 204)

Figuur 44 : De positieve ladingen op de fenoxy-ring van de O-aryl-O-ethyl-fenyl-fosfonaten.

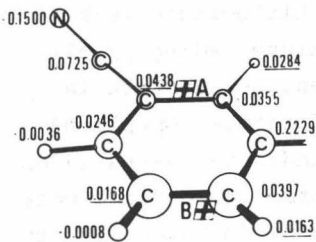
4a



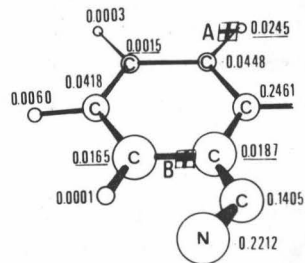
4m



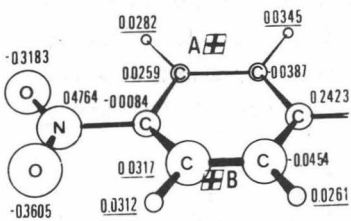
4l



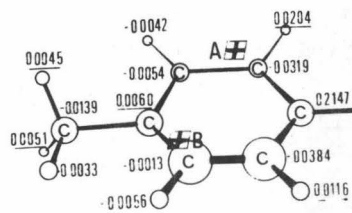
4k



4p



4d



TABEL 29 :

Nr.	Totaal- energie	HOMO	LEMO	Berekende ladingen op								
				P ₃	O ₂	C ₁	C ₁₃	C ₁₄	C ₁₅	C ₁₆	C ₁₇	O ₁₈
4a	- 172,94617	- 0,4358	0,0791	0,4859	- 0,2088	0,2228	- 0,0381	0,0123	0,0276	0,0156	- 0,0440	- 0,4441
4b	- 181,64294	- 0,4245	0,0811	0,4920	- 0,2029	0,2081	- 0,0326	- 0,0002	- 0,0237	- 0,0058	- 0,0034	- 0,4583
4c	- 181,64645	- 0,4331	0,0796	0,4838	- 0,2102	0,2269	- 0,0575	0,0496	- 0,0456	0,0215	- 0,0534	- 0,4406
4d	- 181,64280	- 0,4180	0,0803	0,4849	- 0,2078	0,2147	- 0,0319	- 0,0054	0,0060	- 0,0013	- 0,0384	- 0,4444
4e	- 200,07196	- 0,4113	0,0826	0,4941	- 0,1918	0,1751	- 0,0191	- 0,0180	- 0,0084	- 0,0558	0,1499	- 0,4615
4f	- 200,08045	- 0,4314	0,0785	0,4833	- 0,2112	0,2412	- 0,0962	0,1963	- 0,0935	0,0385	- 0,0710	- 0,4369
4g	- 200,07718	- 0,4062	0,0798	0,4804	- 0,2102	0,1964	- 0,0166	- 0,0443	0,1568	- 0,0493	- 0,0218	- 0,4379
4h	- 188,37024	- 0,4334	0,0767	0,4953	- 0,1964	0,2360	- 0,0390	0,0179	- 0,030	0,0225	0,0380	- 0,4561
4i	- 188,36697	- 0,4407	0,0750	0,4950	- 0,2025	0,2263	- 0,0302	0,0863	- 0,0221	0,0154	- 0,0366	- 0,3467
4j	- 188,37024	- 0,4279	0,0733	0,4968	- 0,2010	0,2352	- 0,0384	- 0,0204	0,0460	0,0237	- 0,0440	- 0,4595
4k	- 190,70435	- 0,4231	0,0837	0,5280	- 0,1733	0,2461	- 0,0448	0,0015	- 0,0418	0,0165	0,0187	- 0,5231
4l	- 190,72141	- 0,4425	0,0744	0,4857	- 0,2097	0,229	- 0,0355	0,0438	- 0,0246	0,0168	- 0,0397	- 0,4405
4m	- 190,72196	- 0,4328	0,0729	0,4847	- 0,2086	0,2296	- 0,0371	0,0167	- 0,044	0,0200	- 0,0429	- 0,4388
4n	- 220,7443	- 0,4103	0,0640	0,5198	- 0,1607	0,2567	- 0,0395	0,0246	- 0,0374	0,0165	- 0,0139	- 0,5082
4o	- 220,76140	- 0,4547	0,0572	0,4864	- 0,2100	0,2241	- 0,0275	0,0359	- 0,0147	0,0169	- 0,0201	- 0,4364
4p	- 220,76532	- 0,4572	0,0597	0,4850	- 0,2103	0,2423	- 0,0387	0,0259	- 0,084	0,0317	- 0,0454	- 0,4328
4q	- 199,93468	- 0,4292	0,0748	0,4816	- 0,2109	0,2046	- 0,0189	- 0,0420	0,1952	- 0,0387	- 0,0247	- 0,4359
4t	- 190,33084	- 0,4185	0,0803	0,4848	- 0,2078	0,2158	- 0,0326	- 0,0057	0,0000	- 0,0039	- 0,0390	- 0,4443
4v	- 203,69298	- 0,4143	0,0699	0,5189	- 0,1781	0,2546	- 0,0388	0,0243	0,0327	0,0560	0,0629	- 0,4954
4y	- 182,01972	- 0,4337	0,0702	0,4896	- 0,2060	0,2298	- 0,0372	0,0168	- 0,0045	0,0199	- 0,0424	- 0,4399
4z	- 199,41985	- 0,4325	0,0739	0,4827	- 0,2097	0,2294	- 0,0371	0,0169	- 0,0043	0,0201	- 0,0431	- 0,4379

Udr. Gosl
Bibliothek
Fas. Leabouww.

O ₄	C ₅	H ₂₉	H ₃₀	H ₃₁	H ₃₂	H ₃₃	d _{AP}	d _{BP}	$\frac{q_A q_P}{d_{AP}}$	$\frac{q_B q_P}{d_{BP}}$
- 0,2163	0,1716	0,0214	- 0,0034	- 0,0106	- 0,0055	0,0126	3,402	4,379	1,594	1,036
- 0,2129	0,1708	0,0197	- 0,0042	- 0,0118	- 0,0058	-	2,905	3,567	1,105	0,734
- 0,2174	0,1716	0,0200	-	- 0,0117	- 0,0069	0,0115	4,135	4,482	3,130	1,180
- 0,2165	0,1715	0,0204	- 0,0042	-	- 0,0056	0,0116	3,726	4,541	1,338	0,790
- 0,2136	0,1705	0,0224	- 0,0028	- 0,0107	0,0059	-	1,262	1,809	2,905	5,337
- 0,2176	0,1722	0,0348	-	- 0,0065	0,0125	0,0002	2,905	4,604	1,918	1,780
- 0,2187	0,1718	0,0233	0,0115	-	0,0076	0,0125	3,629	4,602	1,529	0,695
- 0,2150	0,1710	0,0279	0,0018	0,0035	0,0098	-	3,506	5,181	2,227	1,023
- 0,2131	0,1716	0,0365	-	0,055	0,0015	0,0178	2,905	4,205	2,060	0,858
- 0,2129	0,1710	0,0288	0,0136	-	0,0118	0,0201	3,843	4,675	2,689	1,957
- 0,1984	0,1671	0,0245	0,0003	- 0,0060	- 0,0001	-	2,998	4,906	1,534	0,588
- 0,2178	0,1720	0,0284	-	- 0,0036	- 0,0008	0,0163	2,905	4,334	1,573	1,228
- 0,2186	0,1720	0,0265	0,0047	-	0,0026	0,0177	3,604	4,450	2,134	1,454
- 0,2123	0,1679	0,0344	0,0074	0,0032	0,0227	-	3,716	5,453	3,150	1,288
- 0,2194	0,1730	0,0502	-	0,0238	0,0078	0,0230	2,905	4,716	2,784	2,022
- 0,2207	0,1725	0,0345	0,0282	-	0,0312	0,0261	4,031	4,882	3,531	2,928
- 0,2195	0,1721	0,0273	0,0204	-	0,0186	0,0183	3,841	4,836	1,981	1,217
- 0,2166	0,1715	0,0200	- 0,0044	-	- 0,0011	0,0112	3,501	3,598	1,182	0,623
- 0,2054	0,1690	0,0358	0,0189	-	0,0351	-	3,869	5,257	3,509	2,978
- 0,2087	0,1357	0,0267	0,0054	-	0,0029	0,0178	3,624	4,458	2,188	1,477
- 0,2224	0,1692	0,0264	0,0045	-	0,0025	0,0177	3,602	4,448	2,121	1,448

Volgens het AChE-model van Krupka (55) is de afstand tussen de esterase-plaats en de anionische bindingsplaats 4,1 Å. De afstanden (d_{AP} en d_{BP}) tussen de H^+ -centra en het fosforatoom blijken voor de onderzochte molekulen eveneens van deze grootte te zijn zoals blijkt in tabel 29, doch er zijn wel onderlinge verschillen aanwezig t.o.v. deze "optimale" afstand. Correlatie van de biologische activiteit in vitro met de absolute waarde van het verschil tussen 4,1 en d_{AP} of d_{BP} geeft volgende vergelijkingen :

$$\begin{array}{lcl} pI_{50} = 3,53 - 0,40 & \cdot & |4,1 - d_{AP}| \quad \begin{array}{cccc} n & s & r & F \\ 8 & 1,74 & 0,11 & 0,07 \end{array} \quad (\text{vgl. 205}) \\ & & |4,1 - d_{BP}| \quad \begin{array}{cccc} n & s & r & F \\ 8 & 1,75 & 0,06 & 0,02 \end{array} \quad (\text{vgl. 206}) \end{array}$$

De lading op het fosforatoom (q_p) (tabel 29) vertoont slechts een zeer geringe variatie zodat de fosforyleringskonstante van de reacties tussen de organofosforverbindingen met AChE er weinig door beïnvloed wordt. Correlaties van deze lading q_p met de biologische activiteit in vitro waren dan ook van geen belang :

$$pI_{50} = 5,27 - 0,37 \cdot q_p \quad \begin{array}{cccc} n & s & r & F \\ 8 & 1,71 & 0,01 & 0,00 \end{array} \quad (\text{vgl. 207})$$

Tussen de positieve centra H^+ A en H^+ B enerzijds en de positieve lading op het fosforatoom anderzijds moet er een permanente afstoting optreden waardoor deze twee ladingen gefixeerd worden op een welbepaalde afstand van elkaar. De interactie-energie tussen dipolen kan best omschreven worden door de wet van Coulomb :

$$\frac{q_A \cdot q_p}{d_{AP}} \quad \text{en} \quad \frac{q_B \cdot q_p}{d_{BP}}$$

met q_A en q_B : de positieve lading van H^+ A en H^+ B
 q_p : de positieve lading van het fosforatoom
 d_{AP} en d_{BP} : de afstand tussen beide ladingen.

Deze qq/d -waarden werden berekend (tabel 30) zowel voor het A - als voor het B -centrum. Deze indices zouden eventueel ook goede parameters kunnen zijn voor de fosforyleringsreactie tussen organofosforverbinding en AChE. Correlatie met de biologische aktiviteit in vitro gaf volgende vergelijkingen :

			n	s	r	F	
$pI_{50} = 1,18 + 1,09$	$q_A q_P / d_{AP}$	8	1,48	0,54	2,43	(vgl.208)	
$1,02 + 1,07$	$q_B q_P / d_{BP}$	8	1,35	0,52	2,25	(vgl.209)	

De correlatie van al deze M.O.-indices met elektronische lineaire vrije energieparameters en de novo-parameters welke aangewend werden bij de Hansch-methode en de Free en Wilson-methode (tabel 30) toont het verband aan tussen de qq/d -indice en deze elektronische substituentkonstanten. De netto-lading op P, de afstand d_{AP} en de d_{BP} en de lading q_A en q_B vertoonden geen verband. De beste correlaties werden bekomen voor de para-gesubstitueerde verbindingen :

		n	s	r	F	
$\sigma = -0,69 + 0,42$	qq/d (A)	8	0,23	0,84	14,50 ^{***}	(vgl.210)
$\sigma = -0,43 + 0,43$	qq/d (B)	8	0,22	0,85	16,75 ^{***}	(vgl.211)
$\delta = -0,27 + 0,15$	qq/d (A)	8	0,08	0,84	15,06 ^{***}	(vgl.212)
$\delta = -0,18 + 0,15$	qq/d (B)	8	0,07	0,87	18,15 ^{***}	(vgl.213)
$\mathcal{F} = -0,34 + 0,31$	qq/d (A)	8	0,15	0,86	18,23 ^{***}	(vgl.214)
$\mathcal{F} = -0,11 + 0,29$	qq/d (B)	8	0,18	0,80	11,26 ^{***}	(vgl.215)

Deze qq/d -waarden zijn dus een bruikbaar middel om de elektronische invloeden van de organofosformolekulen te bepalen. Zo worden bv. 75 % ($r^2 = 0,757$) van de elektronische eigenschappen, welke omschreven zijn door de δ -waarde, verklaard. Een mogelijke verklaring voor het gebrek aan verband tussen de biologische aktiviteit en de onderzochte MO-indices is het feit dat de MO-indices wel correleren met \mathcal{F} en niet met \mathcal{R} , terwijl het bij de biologische aktiviteit juist andersom is. Ook de complexiteit van de biochemische reakties, welke betrokken zijn bij de werking van de organofosforverbindingen, kunnen aanleiding geven tot een onvoldoende verklaring van deze wel zeer specifieke MO-indices, omdat ze allen slechts een heel klein facet kunnen verklaren van de eindaktiviteit. Inderdaad, de I_{50}^-

TABEL 30 : Correlatiematrix van de MO-indices met lineaire vrije energie-parameters en de novo-parameters

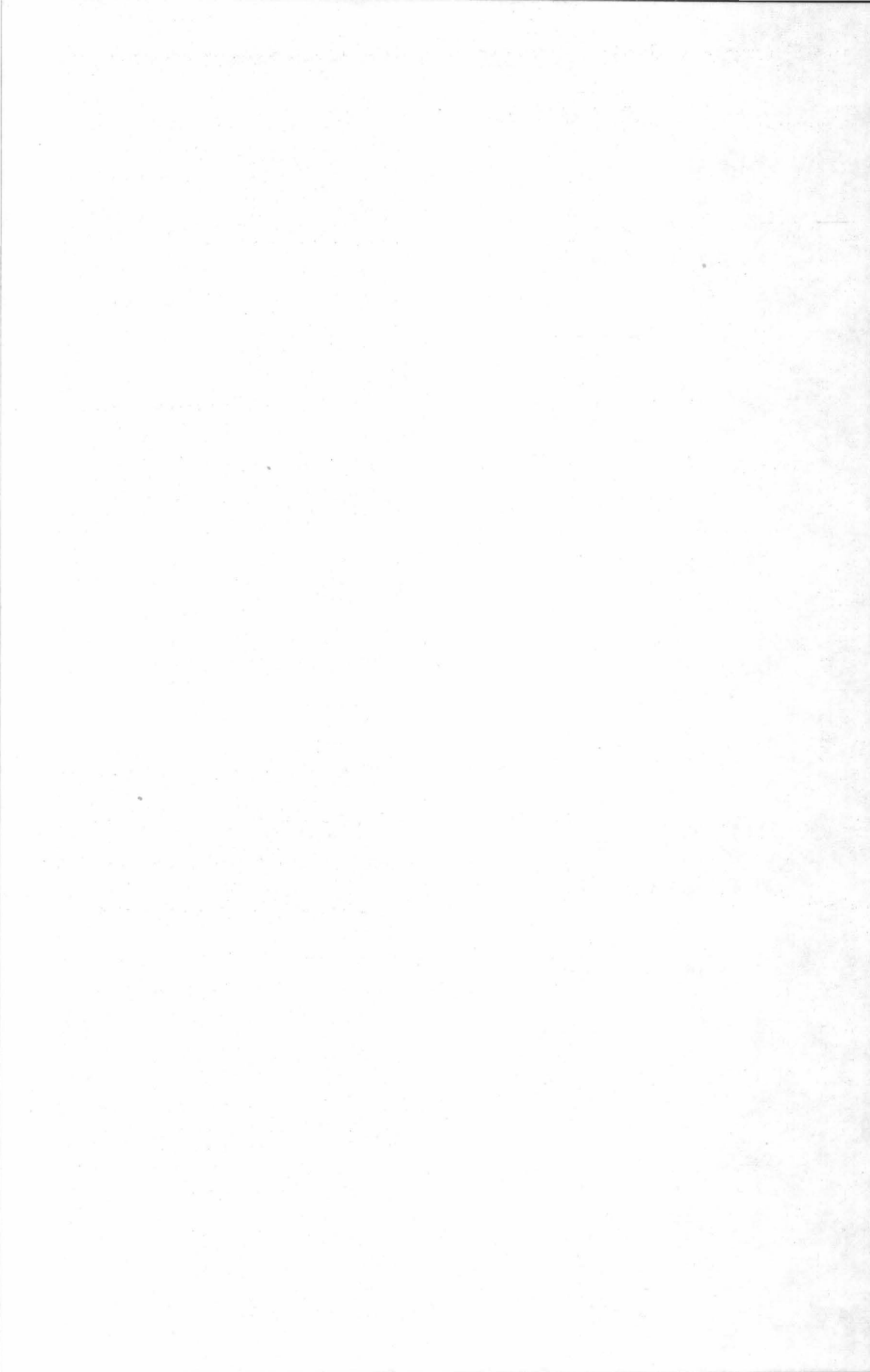
			d_A	d_B	q_P	q_O	$\frac{q_A q_P}{d_A}$	$\frac{q_P q_B}{d_B}$
lineaire vrije-energie parameters	para	σ	0,509	0,395	0,221	0,250	0,841"	0,858"
		σ^-	0,511	0,378	0,133	0,337	0,838"	0,858"
		\mathcal{F}	0,730	0,677	0,096	0,315	0,867"	0,808"
		\mathcal{R}	0,046	0,090	0,265	0,066	0,446	0,538
		$\mathcal{F} + \mathcal{R}$	0,744	0,729	0,299	0,325	0,899"	0,879"
		δ	0,509	0,394	0,222	0,258	0,846"	0,873"
		k_{hydr}	0,456	0,351	0,060	0,211	0,791"	0,825"
		I.R.	0,266	0,023	0,491	0,123	0,668	0,715
	meta	σ	0,719	0,148	0,329	0,081	0,045	0,400
		δ	0,717	0,127	0,336	0,107	0,074	0,382
		k_{hydr}	0,648	0,143	0,094	0,227	0,230	0,369
		I.R.	0,207	0,344	0,208	0,180	0,353	0,380
	ortho	δ	0,732	0,889	0,763	0,718	0,296	0,547
		k_{hydr}	0,595	0,787	0,893"	0,866"	0,276	0,474
		I.R.	0,589	0,682	0,614	0,585	0,106	0,658
	totaal	δ	0,265	0,673"	0,519	0,405	0,424	0,125
		k_{hydr}	0,222	0,500	0,443	0,351	0,386	0,557
		I.R.	0,036	0,282	0,640"	0,573	0,211	0,078
de novo-parameters	para	in vivo	0,286	0,216	0,143	0,298	0,705	0,754"
		in vitro	0,236	0,180	0,099	0,331	0,683	0,824"
		hydrolyse	0,379	0,306	0,297	0,165	0,782"	0,831"
	meta	in vivo	0,577	0,118	0,402	0,116	0,238	0,076
		in vitro	0,566	0,077	0,347	0,059	0,230	0,113
		hydrolyse	0,622	0,111	0,079	0,213	0,313	0,314
	ortho	in vivo	0,646	0,837"	0,755	0,710	0,217	0,495
		in vitro	0,678	0,859"	0,761	0,717	0,173	0,543
		hydrolyse	0,714	0,867"	0,769	0,733	0,212	0,556
	totaal	in vivo	0,120	0,444	0,402	0,013	0,298	0,042
		in vitro	0,123	0,459	0,399	0,005	0,283	0,068
		hydrolyse	0,815	0,562	0,455	0,026	0,345	0,074

waarde bevat zowel informatie van de complexeringsreactie als van de fosforyleringsreactie tussen AChE en organofosforverbinding. De hierbij betrokken krachten zijn in het eerste geval van het Van der Waals-type (in $1/r^7$) en in het ander geval van het elektrostatische type (in $1/r^2$). De Van der Waalskrachten zijn daarenboven nog de resultante van twee verschillende invloeden : van dispersiekrachten (London-krachten) en van polarisatiekrachten. De afstotingsenergie tussen het π -centrum en de positieve lading van het fosforatoom kan dus wel de instabiliteit uitdrukken ten opzichte van de aanval van een nucleofiel reagens zoals blijkt uit de significante relatie tussen de hydrolysekonstante en de q_q/d -indice. Zo is bv. voor de ongesubstitueerde molekulen (4a) de afstotingsenergie 1.036 kcal/mol terwijl de p-nitro-gesubstitueerde molekulen (4p) minder stabiel is, nl. 2,928 kcal/mol (het positief teken wijst op een destabilisatie). Dit heeft voor gevolg dat in correlaties met de biologische activiteit, uitgedrukt als pI_{50} , de q_q/d -indices uitsluitend het verband aangeven met de krachten welke van elektrostatische oorsprong zijn, terwijl deze die invloed hebben op de complexvorming niet behandeld worden. Indien er een vlotte methode zou bestaan om deze I_{50} -waarden te kunnen splitsen in de affiniteitskonstante (K_a) en de fosforylatiekonstante (k_p), dan zou mogelijks een verband kunnen gevonden worden tussen de fosforylatiekonstante en q_q/d , doch helemaal geen met de affiniteitskonstante. Dergelijke technieken zijn moeilijk uitvoerbaar voor een omvangrijke reeks verbindingen en bovendien nogal onnauwkeurig.

Zuiver theoretisch zou men voor de complexeringsreactie tussen de organofosformolekulen en het AChE q_A of $|4,1 - d_{AP}|$ kunnen aanwenden terwijl voor de fosforyleringsreactie q_p en $q_A q_p / d_{AP}$ best geschikt lijken. De I_{50} -waarde die zowel de complexatie als de fosforylering omschrijft zou in principe kunnen gedefinieerd worden als :

$$pI_{50} = a + b \left\{ \begin{array}{c} q_A \\ \text{en/of} \\ |4,1 - d_{AP}| \end{array} \right\} + c \left\{ \begin{array}{c} q_p \\ \text{en/of} \\ q_A q_p / d_{AP} \end{array} \right\} \quad (\text{vgl. 216})$$

Uit de resultaten blijkt echter dat de fosforylering veruit het belangrijkste is voor de biologische aktiviteit wat erop zou wijzen dat de complexering zeer snel verloopt en geen remmende invloed heeft.



DEEL III : EXPERIMENTEEL GEDEELTE

HOOFDSTUK I : SYNTHESE VAN O-ALKYL-ARYL FENYL FOSFONOTHIOATEN
 =====

1. SYNTHESEN

a. Bereiding van fenyldichloorfosfine (1) (6)

165 g (1,2 mol) fosfortrichloride, 23,4 g (0,3 mol) benzeen en 53,0 g (0,4 mol) watervrij aluminiumchloride worden afgewogen en in een kolf van 1 liter gebracht, voorzien van een thermometer, een mechanische roerder en een bolkoeler (met calciumchloride-buisje). Het mengsel wordt verwarmd tot reflux gedurende twee uur onder voortdurend roeren. Het bekomen reactiemengsel wordt herhaalde malen geëxtraheerd met petroleumether (8 x 100 ml). Na indampen van het extractiemiddel wordt het reactieprodukt gedestilleerd onder verminderde druk (kp. 87°C/5 mm Hg). Men bekomt 32 - 35 g fenyldichloorfosfine (1) (rendement 64 - 68 %).

b. Bereiding van fenylfosfonodichloorthioaat (2) (7)

56 g (0,3 mol) thionofosforylchloride wordt toegevoegd aan 60 g (0,3 mol) fenyldichloorfosfine (1) in een kolf van 500 ml voorzien van een thermometer, een mechanische roerder en een bolkoeler. Het mengsel wordt gedurende 1 uur bij 140° verwarmd onder voortdurend roeren. Het reactiemengsel wordt gedestilleerd onder verminderde druk (kp. 170°/10 mm Hg) en men bekomt 35 g fenyldichlorofosfonothioaat (2) (Rendement 92 %).

c. Direkte bereiding van fenylfosfonodichloorthioaat (2) volgens Jensen (8)

23 g (0,3 mol) benzeen, 124 g (0,9 mol) fosfortrichloride en 40 g (0,3 mol) watervrij aluminiumchloride worden afgewogen en in een kolf van 500 ml gebracht, voorzien van een thermometer, een mechanische roerder en een bolkoeler (met calciumchloride-

buisje). Het mengsel wordt gedurende drie uur gerefluxt onder voortdurend roeren. Het reaktiemengsel wordt afgekoeld tot ongeveer 30° en 10 g (0,3 mol) zwavelbloem wordt toegevoegd. Dit gaat gepaard met een korte exothermische reactie waarbij de temperatuur oploopt tot ongeveer 60° en de kleur van lichtgeel naar grijsbruin omslaat. De reactie is beëindigd als de temperatuur daalt. De overmaat fosfortrichloride wordt afgedestilleerd onder verminderde druk en het resterend reaktiemengsel uitgegoten in ijswater. Het mengsel wordt geëxtraheerd met petroleumether (3 x 200 ml) en de gekombineerde extracten opnieuw gewassen met water. Na indampen wordt gedestilleerd onder hoog vacuum (kp. $110^{\circ}/2,5$ mm Hg) en men bekomt 46 g fenylfosfonodichloorthioaat (2) (Rendement 73 %).

d. Bereiding van O-ethyl fenylfosfonochloorthioaat (3) (9,10)

1e methode (9) : 21,5 g (0,1 mol) fenylfosfonodichloorthioaat (2) worden opgelost in 50 ml benzeen in een kolf van 250 ml voorzien van een thermometer, een mechanische roerder en een scheitrichter. Onder voortdurend roeren en bij 0°C wordt een natrium-ethylaatoplossing toegedruppeld welke 0,1 mol natrium bevat. Men laat 10 minuten roeren en het reactieproduct wordt dan uitgegoten in 100 ml ijswater. De benzeenlaag wordt afgescheiden en gedroogd over watervrij natriumsulfaat. Na indampen van de benzeen wordt gedestilleerd onder hoog vacuum (kp. $75^{\circ}/0,01$ mm Hg) en men bekomt 19,5 g O-ethyl fenylfosfonochlorothioaat (3) (Rendement 78 %).

2e methode (10) : 21,5 g (0,1 mol) fenylfosfonodichloorthioaat (2) en 10,2 g (0,1 mol) triethylamine worden opgelost in 50 ml benzeen in een kolf van 200 ml voorzien van scheitrichter, roerder en thermometer. Bij een temperatuur van 10° en onder voortdurend roeren wordt gedurende een half uur 5,2 ml (0,1 mol) ethanol toegedruppeld en vervolgens gedurende een tweetal uren geroerd. De zuivering verloopt analoog als bij de eerste methode (uitgieten in ijswater, enz.) (Rendement 92 %).

e. Bereiding van O-ethyl-O-aryl-fenylfosfonothioaat (4) (10)

Volgende bereiding van O-ethyl-O-p-nitrofenyl fenylfosfonothioaat (4p) illustreert de synthese van 4. Alleen de zuivering ver-

loopt soms anders, zoals vermeld in volgende paragraaf.

2,1 g (0,1 mol) O-ethyl fenylfosfonochlorothioaat (3) en 10,2 g (0,1 mol) triethylamine worden opgelost in 50 ml benzeen in een kolf van 200 ml voorzien van scheitrechter, roerder en thermometer. Bij een temperatuur van 75 - 80°C en onder voortdurend roeren wordt een oplossing van 13,9 g (0,1 mol) p-nitrofenol in benzeen toegedruppeld. Het reaktiemengsel wordt nog gedurende enkele uren gerefluxt. Na afkoelen wordt 200 ml water toegevoegd en de benzeenlaag afgescheiden. Dit benzeenextract wordt nog twee maal gewassen met 200 ml water en daarna gedroogd over watervrij natriumsulfaat. De benzeen wordt ingedampt en het residu kristalliseert snel uit. Na herkristallisatie in benzeen/hexaan bekomt men kleurloze naalden (smeltpunt 36°) 4p. (Rendement 90 %).

f. Direkte bereiding van O-alkyl-O-aryl fenylfosfonothioaat (4)
(11)

Volgend voorbeeld illustreert de bereiding van 4p. De syntheses van de andere produkten verlopen analoog. Alleen de zuivering verloopt soms verschillend zoals vermeld in volgende paragraaf

In een kolf, voorzien van thermometer, roerder en scheitrechter, worden 100 ml benzeen en 63,3 g (0,31 mol) fenylldichlorofosfonothioaat (2) gemengd. Een oplossing van 15,3 g (0,30 mol) ethanol en 31,3 g (0,31 mol) triethylamine wordt toegedruppeld bij een temperatuur van 35 - 40°C, in een half uur. Dit viskeus mengsel wordt gedurende 2 uur bij 40°C geroerd. Daarna wordt een mengsel van 43,1 g (0,31 mol) p-nitrofenol en 33,3 g (0,31 mol) triethylamine toegedruppeld in een tijdsspanne van een twintigtal minuten waardoor de temperatuur stijgt tot ongeveer 60°C. Dit mengsel wordt nog gedurende een uur bij 60° geroerd. Na afkoelen voegt men 200 ml water en 200 ml benzeen toe en wordt het mengsel overgebracht in een scheitrechter. De benzeenlaag wordt nog twee maal gewassen met 200 ml water en daarna gedroogd over watervrij natriumsulfaat. Het extractiemiddel wordt onder verminderde druk ingedampt en het residu kristalliseert snel uit. Na herkristallisatie in benzeen/hexaan bekomt men 74,4 g kleurloze naalden (smeltpunt 35°) 4p (Rendement ± 80 %).

2. ZUIVERING VAN HET BEKOMEN EINDREAKTIEPRODUKT

a. Adsorptie kolomchromatografie

Materiaal : Glazen kolom van 60 cm lengte en 2,5 cm inwendige diameter

adsorbens : florisil (300 mesh) vooraf gekonditioneerd gedurende 12 h bij 110°C

eluentia : n-hexaan, chloroform en aceton

Methode : 50 g florisil suspenderen in 150 ml hexaan en in de kolom gieten. De hexaan aflaten tot juist boven de vulling. 3 à 5 g reaktiemengsel oplossen in 50 ml n-hexaan, op de kolom gieten en laten elueren. 75 ml hexaan op de kolom brengen en tegelijkertijd fraktie I van 75 ml opvangen (elutiesnelheid 6-8 ml/min). Vervolgens wordt telkens 75 ml-porties van een toenemend polair elutiemiddel toegediend en een 75 ml-fraktie opgevangen. Tabel 31 geeft de samenstelling van de opeenvolgende elutiemiddelen.

TABEL 31 : Samenstelling van de frakties voor kolomchromatografie

Fraktienummer	Samenstelling in vol - %		
	n-Hexaan	Chloroform	Aceton
I	100	-	-
II	100	1	-
III	99	2	-
IV	98	5	-
V	95	10	-
VI	90	20	-
VII	80	25	-
VIII	74,5	25	0,5
IX	74	25	1
X	73	25	2
XI	71	25	4
XII	67	25	8
XIII	60	25	15
XIV	20	50	30
XV	-	50	50

De verschillende frakties, opgevangen in een tipkolf van 100 ml, worden onder vacuum ingedampt. Naargelang de substituenten kwamen de fosfonothionaten voor in de 9^e tot de 11^e fraktie met een grote zuiverheid (> 95 %).

b. Preparatieve dunnelaagchromatografie

Materiaal : - TLC-platen (Merck 5717) met een 2 mm-dikke laag
silicagel 60 GF₂₅₄
- eluentia : hexaan, chloroform, aceton

Methode : Een hoeveelheid van ongeveer 1 gram reaktiemengsel wordt met een micropipet streepvormig op de plaat gebracht. De plaat wordt geëlueerd met hexaan/aceton (99/1 vol:vol). De zone met het fosfonothionaat wordt gelokaliseerd onder UV-licht (254 nm) als een donkere streep en wordt afgekrabd. Dit poeder wordt overgebracht in een buisje van Allihn en het fosfonothionaat wordt geëlueerd met 75 ml hexaan/chloroform/aceton (60/25/15). Het eluaat wordt ingedampt en men bekomt 4 met een grote zuiverheid (> 99 %).

c. Preparatieve gaschromatografie

Materiaal : gaschromatograaf Varian 2700
kolom : - pyrex 3 m lengte en 0,5 cm inwendige diameter
- gevuld met SE 30 12 % op Chromosorb W 60-80
gassnelheid (N₂) : \pm 50 ml/min
oventemperatuur : 250°
detector : Thermal Conductivity Detector.

Methode : 10 μ l reactieproduct wordt ingespoten in de gaschromatograaf en het thiofosfonaat 4 wordt opgevangen in een kapillair buisje dat geplaatst wordt onmiddellijk na de detektor. De zuiverheid is hoger dan 99,5 %.

d. Hoog-vacuumbdestillatie

Een klassieke opstelling met een koele val en een hoog vacuum-pomp werd in sommige uitzonderlijke gevallen aangewend doch werd wegens de thiono- thiolo isomerisatie weinig gebruikt.

e. Herkristallisatie

Sommige produkten zijn kristallijn en kunnen dus gezuiverd worden door herkristallisatie in benzeen/hexaan.

3. SPEKTRA

a. I.R.-spektra

I.R.-spektra werden genomen op een Perkin Elmer 257 spektrofotometer. Vaste stoffen werden met kaliumbromide gemengd en tot een plaatje geperst; vloeistoffen werden tussen twee natrium-chloride kristallen geplaatst.

b. N.M.R.-spektra

N.M.R.-spektra werden genomen op een Varian T60-N.M.R.-spektrofotometer. Ongeveer 30 mg werd opgelost in tetrachloorkoolstof en tetramethylsilaan werd aangewend als inwendige standaard.

c. Massaspektra

Massaspektra werden genomen op een AEI-MS 30 (70 EV) massaspektrometer.

HOOFDSTUK II : BEPALING VAN DE CHEMISCHE EIGENSCHAPPEN VAN O- =====

ALKYL-O-ARYL FENYLFOSFONOTHIOATEN =====

1. BEPALING VAN DE HYDROLYSEKONSTANTE

a. Gaschromatografisch

De hydrolyse-reakties worden uitgevoerd in een thermostatisch gecontroleerd warmwaterbad van 60°C. In een kolf van 0,5 l wordt 2 ml van een stockoplossing van 1.000 ppm O-alkyl-O-aryl fenyfosfonothioaat in aceton gebracht. Door de verbindingen zodanig uit te kiezen dat hun retentietijden (G.L.C.) verschillend zijn is het mogelijk meerdere thiofosfonaten samen in dezelfde kolf te brengen (tot vijf). De aceton wordt drooggedampt onder een luchtstroom en 500 ml fosfaatbuffer (vooraf op 60°C gebracht) wordt toegevoegd. Deze orthofosfaatbuffers met variërende zuurtegraad hebben echter een konstante ionensterkte (0,2 M) (124). De samenstelling van deze fosfaatbuffers is als volgt (tabel 32):

TABEL 32 : Fosfaatbuffer-samenstelling

pH berekend	pH gemeten	H ₃ PO ₄ 85% (ml)	KH ₂ PO ₄ (g)	Na ₂ HPO ₄ (g)	Na ₂ HPO ₄ · 7 aq (g)	Na ₃ PO ₄ (g)
3,0	3,0	1,35	27,2	-	-	-
5,0	5,0	-	25,8	0,43	-	-
7,0	7,0	-	4,7	-	14,80	-
9,2	9,1	-	-	9,47	-	-
11,2	10,8	-	-	8,17	-	1,74

De pH-waarde werd vooraf gecontroleerd met een Beckman Model H3 pH-meter. De kolf wordt gedurende een minuut goed geschud om een volledige oplossing van de thiofosfonaten te bekomen. Vervolgens wordt een aliquot van 25 ml gepipetteerd in een scheitrechter van 100 ml. De tijd op een chronometer wordt ingesteld als

t = 0. Aan deze scheidrecther wordt een vooraf bepaalde hoeveelheid H_3PO_4 (5N) of NaOH (5N) toegevoegd nodig om de pH van de oplossing op 7,0 - 7,4 te herleiden. De thiofosfaten worden vervolgens geëxtraheerd met 2 x 20 ml n-hexaan. De gekombineerde extrakten worden gedroogd over watervrij natriumsulfaat in een buisje volgens Allihn. Er wordt nagespoeld met 10 ml n-hexaan. Het eluaat wordt opgevangen in een maatkolfje van 50 ml en n-hexaan bijgevoegd tot 50 ml. De extrakten worden bewaard bij 4° tot de volledige reeks bekomen is. De concentraties van de thiofosfonaten worden gaschromatografisch kwalitatief en kwantitatief bepaald t.o.v. de korresponderende standaardreeksen. Hiervoor wordt een gaschromatograaf Varian 2700 gebruikt, uitgerust met een FPD-detector (fosfor-filter). De kolom is van pyrex-glas (3 m lang, 0,2 ml inwendige diameter) en is gevuld met 1 % OV225 op Gaschrom Q. De gassnelheden zijn voor stikstof 120 ml/min, voor waterstof 100, voor lucht 235 en voor zuurstof 10. De temperatuur van de kolom is 220° en van de injector 225°.

b. Spektrofotometrisch

Een bufferoplossing van de thiofosfonaten wordt op een analoge wijze bereid als bij de gaschromatografische methode, met die restrictie dat nu slechts één enkele verbinding kan genomen worden per beurt. Een kwartskuvet met 1 cm lichtdoorgang wordt ermee gevuld en op 60° gebracht in een thermostatisch gekontroleerd warmwaterbad. Na regelmatige tussenpozen wordt de kuvet in een U.V.-Vis-spektrofotometer model Varian-Techtron 635 geplaatst en de absorptie van het vrijgekomen gesubstitueerde (R^2) fenoxide-ion wordt gemeten t.o.v. orthofosfaatbuffer als referentie. De absorptie waarbij gemeten moet worden werd vooraf bepaald als de maximale absorptiepiek in het U.V.-Vis spectrum van het zuiver fenol. Deze werkwijze is mogelijk daar de zeer korte meettijden (15 sec) zeer gering zijn vergeleken met de reaktietijd (min. 10 minuten). De hydrolysekonstanten worden bepaald door de absorptiestijging uit te zetten t.o.v. de tijd. Dit verband werd ook berekend door de methode der kleinste kwadraten; een Fortran IV-programma werd opgesteld om dit rekenwerk te vergemakkelijken. De maximumabsorptie werd vooraf bepaald en is voor p-nitrofenol 400 nm, voor m-nitrofenol 389 nm,

voor o-nitrofenol 415 nm en voor p-cyanofenol 275 nm.

c. Enzymatisch

Dezelfde werkwijze wordt gevolgd als bij de gaschromatografische methode, doch een aliquot wordt direkt genomen voor de enzymatische bepaling van de restaktiviteit (zie hoofdstuk IV, 2 en 3).

2. OXYDATIE TOT HET FOSFONAAT

Verdund broomwater werd bekomen door 0,4 ml verzadigd broomwater toe te voegen aan 100 ml gedestilleerd water. Van deze oplossing werd 0,1 ml toegevoegd aan 0,9 ml van een waterige standaardoplossing van het thiofosfonaat. De concentratie van het broomreagens bleek niet kritisch te zijn zodat tienvoudige concentraties hetzelfde resultaat geven. De oxydatiereactie treedt dadelijk in zodat inkubatietijden overbodig zijn. Voor de gaschromatografische controle van de oxydatie moet eerst geëxtraheerd worden met n-hexaan en dit extrakt gedroogd over watervrij natriumsulfaat in een buisje volgens Allihn. Het eluaat wordt ingedampt onder vacuum en het residu heropgelost in 1 ml n-hexaan. De G.L.C.-omstandigheden zijn beschreven bij de π_{GLC} -bepaling.

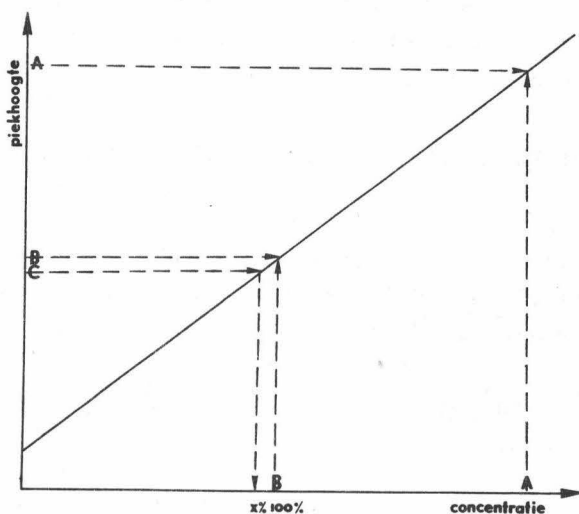
HOOFDSTUK III : BEPALING VAN DE FYSICOCHEMISCHE EIGENSCHAPPEN

VAN O-ALKYL-O-ARYL FENYLFOFONOTHIOATEN

1. BEPALING VAN DE VERDELINGSCOËFFICIËNT k/l

Van een insecticide stockoplossing van 100 ppm in aceton wordt 0,5 ml gepipetteerd in een geïgradueerde reageerbuis. Het oplosmiddel wordt ingedampt en 5 ml n-oktanol (vooraf verzadigd met water) wordt toegevoegd. Na goed schudden wordt 2 μ l (A) ingespoten in de gaschromatograaf en de piekhoogte gemeten. Vervolgens wordt nogmaals 5 ml n-oktanol toegevoegd en na schudden spuit men opnieuw 2 μ l (B) in. Deze twee bekomen piekhoogten laat toe een standaardkurve op te stellen (zie fig. 46). 10 ml water (vooraf verzadigd met n-oktanol) worden dan toegevoegd. De proefbuis wordt gedurende 1 minuut goed geschud en dan gecentrifugeerd gedurende 5 minuten bij 2.000 t/min. 2 μ l (C) van de organische fase wordt ingespoten in de gaschromatograaf en de concentratie bepaald aan de hand van de standaardkurve opgesteld met de responses van (A) en (B) (zie fig. 46). De verdelingscoëfficiënt wordt berekend als $k/l = \frac{x}{1-x}$ met als x de procentuele hoeveelheid die blijft in de organische fase.

Figuur 45 : Standaardkurve voor de bepaling van de verdelingscoëfficiënt



2. BEPALING VAN ΔR_M -WAARDEN

a. Bepaling van ΔR_M -waarden met reversed-phase dunnelaag-chromatografie

Glasplaten (20 x 20 cm) werden bedekt met een laag Silicagel (GF254 van 0,25 nm dikte door een mengsel van silicagel en water (25/100 w/v) uit te spreiden met een Degusa-applicator. Na drogen bij kamertemperatuur gedurende twee uur en vervolgens bij 105° gedurende 10 minuten werden de platen geïmpregneerd door een 5 %-ige oplossing (v/v) van minerale olie (Liquid Paraffin, B.P.) in hexaan te laten lopen tot de bovenkant van de plaat. Het oplosmiddel wordt dan verdampt bij 40°. De produkten (3 µg/spot) werden toegepast met een interval van 1,5 cm langs een lijn 2 cm van de onderzijde van de plaat, zodanig dat ze 1 cm boven het loopmiddel uitsteken. Om elke systematische fout te vermijden worden de verbindingen gespot op bepaalde posities bekomen door een voorafgaandelijk opgestelde "random allocation". Daarbij wordt het niet-gesubstitueerde produkt 4a op alle platen als standaard angewend. De platen worden in een chromatografietank geplaatst onder evenwichtsomstandigheden. De mobiele fase werd vooraf verzadigd met stationaire fase. De platen werden uitgenomen als het loopmiddel ongeveer 15 cm heeft afgelegd. De platen worden dan gedroogd aan de lucht en de verbindingen werden gelokaliseerd onder U.V.-licht (254 nm) als donkere vlekken. De verschillende loopafstanden werden gemeten en de R_F -, R_M - en ΔR_M -waarden t.o.v. het niet-gesubstitueerd produkt berekend.

b. Bepaling van ΔR_M -waarde met polyamide dunnelaagchromatografie

Glasplaten (20 x 20 cm) werden bedekt met een laag Polyamide 11 F254 (Merck) van 0,25 mm dikte door een mengsel van polyamidepoeder en water (25/100 w/v) uit te spreiden met een Degusa-applicator. De platen werden horizontaal gehouden en gedroogd bij 60° gedurende 1 uur. Op een analoge wijze als bij reversed phase TLC werden dan de R_F -, R_M - en ΔR_M -waarden bepaald.

3. BEPALING VAN π_{GLC} -WAARDE

Een standaardoplossing van 10 ppm wordt aangelegd voor elk van de gesynthetiseerde O-alkyl-O-aryl fenylfosfonothioaten. 5 μl ervan wordt geïnjecteerd in een Varian 2700 gaschromatograaf uitgerust met een FPD detector (fosfor-filter). De 3 kolommen zijn van pyrex-glas (3 m lang, 2 mm inwendige diameter) en resp. gevuld met :

- 1° - 3 % OV101 op Gaschrom. Q
- 2° - 3 % OV225 op Gaschrom. Q
- 3° - 3 % DEGS op Gaschrom. Q

De G.L.C.-omstandigheden zijn :

injector t°	: 225°C
oven t°	: 220°C
carrier gas (N ₂)	: 60 ml/min
zuurstof	: 12 ml/min
waterstof	: 100 ml/min
lucht	: 30 ml/min

De relatieve retentietijden werden berekend t.o.v. de niet-ge-substitueerde verbinding 4a. π_{GLC} -waarden werden bekomen door deze retentietijden te logaritmeren.

HOOFDSTUK IV : BEPALING VAN DE BIOLOGISCHE AKTIVITEIT VAN O- =====

ALKYL-O-ARYL FENYLFOSFONOTHIOATEN =====

1. BEREIDING VAN ENZYMEPREPARATEN

300 g vliegengoppen worden gehomogeniseerd in 1 l gedestilleerd water, 92 ml butanol en 9,2 mg natriumtaurocholaat. Dit mengsel wordt gedurende 72 uren bij +4°C geroerd en vervolgens afgefiltreerd over glaswol. Het filtraat wordt gecentrifugeerd bij 6000 g gedurende 30 minuten. Het supernatans wordt gedialyseerd met 20 volumens fosfaatbuffer (0,003 M en pH 7) bij +4°C. De dialyse wordt twee maal herhaald met een interval van 12 uur. De inhoud van het dialysemembraan wordt opnieuw gecentrifugeerd gedurende 30 minuten bij 6.000 g. 5 ml 0,01 M choline-oplossing wordt aan het supernatans toegevoegd. Deze oplossing wordt, eventueel na verdunning, aangewend als AChE-preparaat.

2. BEPALING VAN DE I_{50} -WAARDE

Voor de remming van AChE door O-alkyl-O-aryl fenylfosfonothioaten te bepalen worden een reeks standaardconcentraties van deze inhibitoren toegevoegd overeenkomstig volgend proefopzet:

Testkuvet	Referentiekuvet
0,05 ml fosfonaat in aceton	0,05 ml fosfonaat in aceton
0,1 ml enzymepreparaat	0,1 ml enzymepreparaat
0,95 ml gedestilleerd water	0,95 ml gedestilleerd water
15' inkuberen	
1 ml substraatoplossing	1 ml gedestilleerd water
0,5 ml DTNB-oplossing	0,5 ml DTNB-oplossing

Daar echter de fosfonaten niet beschikbaar zijn doch wel de thiofosfonaten moeten eerst deze verbindingen geoxydeerd worden als volgt :

Testkuvet	Referentiekuvet
0,05 ml thiofosfonaat in aceton	0,05 ml thiofosfonaat in aceton
0,1 ml enzymepreparaat	0,1 ml enzymepreparaat
0,95 ml verdund broomwater	0,95 ml verdund broomwater
15' inkuberen	
1 ml substraatoplossing	1 ml gedestilleerd water
0,5 ml DTNB-oplossing	0,5 ml DTNB-oplossing

De DTNB-oplossing bevat 10 mg DTNB in 50 ml fosfaatbuffer (0,005 M; pH 7). Voor substraatoplossing wordt 37,5 mg acethylthiocholine-iodide opgelost in 12,5 ml gedestilleerd water. De lezing gebeurt bij 410 nm. De absorptiestijging wordt gemeten en de I_{50} -waarde bepaald zoals vermeld op blz. 72

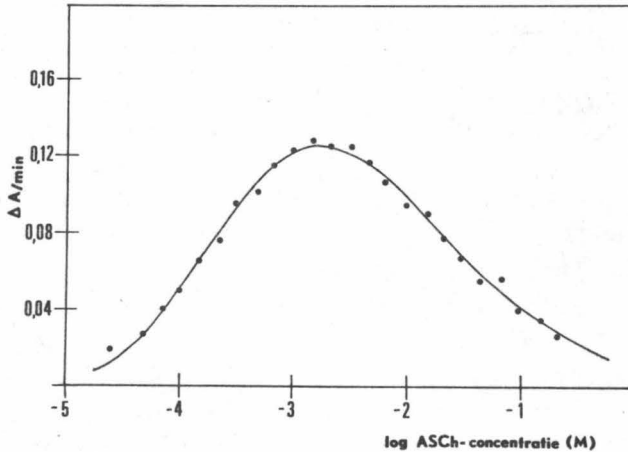
3. AUTOMATISATIE VOOR I_{50} -WAARDE BEPALINGEN

Een auto-analyzer systeem bestaande uit een monsterwisselaar, een proportionele pomp met 12 kanalen, twee warmwaterbaden met inkubatiespiralen en een kolorimeter met recorder worden opgesteld volgens fig. 20. De volgende oplossingen en reagentia worden aangewend :

- Soerensen fosfaatbuffers (1/15 M; pH 7 en 8)
- AChE-preparaat (zie blz. 189)
- Een stockoplossing van 200 mg DTNB in 100 ml buffer pH 7.
- 150 ml ASCh opgelost in 10 ml DTNB-stockoplossing en aangelengd tot 100 ml met gedestilleerd water.
- Stockoplossingen (10.000 ppm) van de O-alkyl-O-aryl fenylfosfonothioaten.
- Verdund broomwater* (4 ml verzadigd broomwater en 100 ml water).

De absorptie wordt kontinu gemeten in een doorstroomkuvet bij 420 nm. Om een optimale enzymaktiviteit te bekomen werd de bestpassende ASChI-koncentratie vooraf manueel bepaald zoals afgebeeld in fig. 46.

Figuur 46 : Bepaling van de optimale ASChI-concentratie.



Er moet dus gezorgd worden dat de eindconcentratie aan ASChI in de omgeving van 10^{-3} M ligt. Door de diameter van de leidingen zodanig te selekteren is het mogelijk deze concentratie te benaderen (Tabel 33).

TABEL 33 : Debiet van de pumping-tubes van de geautomatiseerde Ellman-methode

pumping-tube	ml/min
inhibitor	0,453
Br ₂ -water	0,327
Substraat	0,806
Buffer	0,850
Enzyme	0,806
Totaal	3,242

Rekening houdend met het molekulair gewicht (289) en de aangevande concentratie (150 mg/100 ml) van het ASChI wordt de eindconcentratie :

$$\frac{0,806}{3,242} \times \frac{150}{100} \times \frac{1}{289} = 1,29 \times 10^{-3} \text{ M}$$

Om mogelijke absorptie van de O-alkyl-O-aryl fenylfosfonothioaten te vermijden worden zoveel mogelijk glazen buisjes genomen. Voss (125) gaf eveneens de voorkeur aan Acidflex-tubes i.p.v. de normale Solvaflex-tubes.

4. BEPALING VAN DE LD₅₀-WAARDE

Huisvliegen van 4 dagen oud werden met een aspiratorsysteem gevangen en geïsoleerd in een speciaal gekonstrueerde kooi waarin ze gemakkelijk kunnen verdoofd worden met CO₂-gas. Een dertigtal wijfjes werden in aparte kooitjes gestoken en werden gevoed met suikerwater. Na een tweetal uren werden de vliegen gedurende 1 minuut verdoofd met diethyletherdampen. De insecten werden behandeld met 1 µl van een insecticide-oplossing in acetone. Deze toepassing gebeurt op de thorax met een Arnold microapplicator, d.i. een automatische en regelbare micrometer syringe (Buckard Scientific Sales, Rickmansworth, Herts, England). Elke concentratie wordt driemaal herhaald op drie verschillende dagen en een reeks van 5-6 concentraties is voldoende voor een goed LD₅₀-bepaling. Alvorens deze concentratiereeks te kunnen opstellen wordt voorafgaandelijk een logaritmische testreeks (1 - 10 - 100 - 1.000 - 10.000 vg/vlieg getoetst om het gebied van de definitieve reeks te schatten; deze reeks werd dan opgesteld volgens een meetkundige reeks (bvb. 10 - 20 - 40 - 80 - 160 - 320 vg/vlieg). De behandelde insecten werden samen met onbehandelde vliegen als blanco, opnieuw in de kooitjes geplaatst, gevoed met suikerwater en gedurende 24 uur in een geklimatiseerde ruimte geplaatst (25°C, 70 % r.v.). Na 24 uur wordt het aantal dode insecten geteld. De waargenomen mortaliteiten werden gecorrigeerd t.o.v. de natuurlijke sterfte volgens de formule van Abbott (126) :

gecorrigeerd % mortaliteit =

$$\frac{\% \text{ mortaliteit} - \% \text{ mortaliteit van de getuige}}{100 - \% \text{ mortaliteit van de getuige}} \times 100$$

De LD₅₀-waarde werd berekend volgens de methode beschreven door Finney⁽⁷⁾. Een Fortran-programma werd opgesteld en de berekeningen werden uitgevoerd met de Siemens-computer van het digitaal rekencentrum van de R.U.G..

DEEL IV : ALGEMENE SAMENVATTING EN BESLUIT

Het verband tussen de scheikundige structuur en de insecticide aktiviteit van een reeks O-alkyl-O-aryl fenylfosfonothioaten werd bestudeerd. Deze verbindingen hebben een karakteristieke fosfor-koolstofbinding, dit in tegenstelling met de andere organische fosforinsecticiden welke allen zuurstof- en/of zwavelbruggen aan het fosforatoom vertonen.

De uitgevoerde syntheses worden beschreven. De synthesesetijd kon aanzienlijk verminderd worden door de vier aparte synthesestappen paarsgewijze te laten verlopen zonder intermediaire zuivering van het reaktiemengsel, wat ook voordelig was voor het totaalrendement.

Daar de I.R.-, N.M.R.- en massa-spektra van deze verbindingen slechts zeer onvolledig in de literatuur beschreven zijn is het nodig gebleken deze spektra nader te onderzoeken. De I.R.-spektra vertonen enkele typische vibraties : P-O-alkyl, P-C_{arom} en P-O-C_{arom}. Verschuivingen van frekwenties, vooral bij de P-O-C_{arom}-absorptie blijken zeer afhankelijk te zijn van de aromatische substitutie. De N.M.R.-spektra vertonen long-range koppelingen te wijten aan de interacties met het ³¹P-atoom, zo dat de P-H koppelingskonstante afhankelijk is van de afstand tussen de beschouwde protonen en het fosforatoom. De massa-spektra zijn gekarakteriseerd door enerzijds een typische α-splitsing aan de P=X binding en anderzijds een thermische isomerisatie tussen >P(S)-O- en >P(O)-S-. Het fragmentatiepatroon van de verschillende verbindingen blijkt te verlopen volgens de Biemann-verschuivingsregel.

De fysicochemische eigenschappen van deze verbindingen werden onderzocht met het oog op een verdere studie van het verband ervan met de biologische aktiviteit.

Volgende eigenschappen werden bepaald :

1. De hydrolyse-konstanten bij verschillende zuurtegraden
2. De verdelingscoëfficiënten tussen een hydrofiel en lypofiel midden

3. De dunnelaagchromatografische R_M -waarden volgens de reversed-phase techniek en op polyamide-platen
4. De gaschromatografische retentieparameters op stationaire fazen met verschillende polariteit.

Voor de bepaling van de insekticide werking zijn zowel de in vitro aktiviteit op acetylcholinesterase als de in vivo toxiciteit op de huisvlieg, bij middel van een topische toracale toepassing, bepaald.

Aan de hand van deze insekticide eigenschappen kan getracht worden het verband te leggen tussen de chemische structuur en de werking.

Een drietal methodes worden daarvoor toegepast :

1. Het lineaire vrije-energie model (Hansch)
2. Een mathematisch additief model (Free en Wilson)
3. Een molekule-orbitaal model.

De Hansch-methode bestaat erin de biologische aktiviteitsparameters (zowel de in vitro I_{50} -waarde als de in vivo LC_{50} -waarde) te correleren met vrije-energieparameters of met aanverwante experimenteel bepaalde waarden. Men postuleert dat de biologische aktiviteit van een bio-aktieve verbinding afhankelijk is van de elektronische, hydrofobe en sterische eigenschappen van de molekule. Voor elk van deze factoren kunnen lineaire vrije-energieparameters aangewend worden zoals σ -waarden voor de elektronische invloeden, π -waarden voor de hydrofobe invloeden en E_S -waarden voor de sterische invloeden zo dat :

$$\log (1/C) = a\pi + b\sigma + cE_S + d$$

In eerste instantie moet echter het verband nagegaan worden tussen deze theoretische konstanten en de experimenteel bepaalde parameters zoals hydrolysekonstanten, I.R.-stretchingvibraties, ΔR_M -waarden en π_{GLC} -waarden. Zo blijken hydrolysekonstanten en I.R.-gegevens zeer goed te correleren met elektronische parameters. π_{GLC} -waarden op een apolaire stationaire fase vertonen een verband met sterische invloeden doch naargelang de polariteit stijgt spelen de elektronische invloeden

een grotere rol. ΔR_M -waarden vertonen daarentegen een sterke correlatie met hydrofobe parameters mits een voldoende polair loopmiddel aangewend wordt.

Correlatie van de biologische aktiviteit met deze fysicochemische parameters toont aan dat bijna uitsluitend elektronische factoren een rol spelen bij de werking van deze onderzochte insekticiden, wat wel uitzonderlijk is aangezien bij de meeste structuur-aktiviteitsstudies gebleken is dat de biologische aktiviteit vooral bepaald wordt door hydrofobe factoren. Opvallend is ook het duidelijke verband tussen in vitro-werking en in vivo-aktiviteit.

In een tweede benadering wordt de biologische aktiviteit voorgesteld als de som van de aktiviteit van de basismolekule (μ) en de aktiviteitsbijdrage van de verschillende substituenten(a):

$$\text{Biologische aktiviteit} = \mu + \sum a$$

Met deze methode blijkt dat de bijdrage van sterke elektrofiële groepen (zoals nitro- en cyano) een zeer grote aktiviteitsstijging teweegbrengen. Correlatie van deze aktiviteitsbijdragen met elektronische lineaire vrije-energieparameters en experimentele waarden bevestigen opnieuw de sterke elektronische afhankelijkheid van de biologische aktiviteit.

Om een betere verklaring te kunnen geven aan deze elektronische invloeden op de insekticide werking wordt in een laatste techniek getracht door molekule-orbitaalberekeningen dit verband op molekulaïr niveau te verklaren. Aan de hand van kwantummechanische berekeningen is het mogelijk de ladingen op de verschillende atomen van de molekule te bepalen en te lokaliseren. Hieruit blijkt duidelijk dat er zich een positieve lading bevindt aan weerszijden van de fenoxide-groep. Deze lading en de lokalisatie ervan is afhankelijk van de substituenten en kan gecorreleerd worden met de elektronische vrije-energie parameters. Een tweede vaststelling is de grote overeenkomst van de ruimtelijke structuur van acetylcholine met de berekende ruimtelijke structuur van de fosfonaten, wat er duidelijk op wijst dat deze insekticiden op een analoge wijze complexeren

met de aktieve plaatsen van het acetylcholinesterase.

Uit deze drie verschillende benaderingswijzen van de structuur-aktiviteitsrelatie blijkt duidelijk dat vooral de elektronische factoren een grote rol spelen bij de bepaling van de insekticide werking van de onderzochte thiofosfonaatesters. Deze technieken geven ook nog het voordeel dat het gevonden verband kwantitatief uitgedrukt is. Deze methoden kunnen zeer waardevol zijn voor de deduktie van de biologische aktiviteit van aanverwante fosforinsekticiden.

DEEL V : LITERATUURLIJST

1. GALLEY, R.A.E., Unido Workshop on Pesticides, 1973.
2. LEVER, B.G., STRONG, W.M., EPPO Bulletin, 3, 119 (1973).
3. LARSSON, L., HOLMSTEDT, B., TJUS, E., Acta Chem. Scand., 8, 1563 (1954).
4. ANONYM, J. Chem. Soc., 1952, 5122.
5. PALMER, G., World Rev. Pest. Control., 9, 128 (1970).
6. KOSOLAPOFF, G.M., HUBER, W.F., J. Amer. Chem. Soc., 69, 2020 (1947).
7. DYE, W.T., J. Amer. Chem. Soc., 70, 2595 (1948).
8. JENSEN, W.L., United States Patent, 2.662.917 (1953).
9. JELINEK, A.G., United States Patent, 2.503.390 (1948).
10. SHINDO, N., WADA, S., OTA, K., SUZUKI, F., OHATA, I., United States Patent, 3.327.026 (1967).
11. BECK, T.M., KLEIN, G.I., Deutscher Bundesrepublik Patent, 1.111.629 (1961).
12. O'BRIEN, R.D., in "Toxic Phosphorus Esters", Acad. Press, New York (1960).
13. INGRAHIM, L.L., CORSE, J., BARLEY, G.F., STETT, F., J. Amer. Chem. Soc., 74, 2297 (1952).
14. FUKUTO, T.R., METCALF, R.L., J. Agr. Food Chem., 4, 930 (1956).
15. BELLANY, L.J., in "The Infrared Spectra of Complex Molecules", J. Wiley, New York, p. 312 (1958).
16. BABAD, H., HERBERT, W., GOLDBERG, M.C., Anal. Chim. Acta, 41, 259 (1968).
17. JÖRG, J., HOURIET, R., SPITELLER, G., Monatsk. Chem., 97, 1064 (1966).
18. FEST, C., SCHMIDT, K.J., in "The Chemistry of Organophosphorus Pesticides", Springer-Verlag, Berlin, p. 25 (1973).
19. GIANG, P.A., HALL, S.A., Anal. Chem., 23, 1830 (1951).
20. ARCHER, T.E., "Enzymatic Methods" in "Analytical Methods for Pesticides, Plant growth regulators and Food additives", Vol. 1, Hoofdstuk 14, G. Zweig, Ed., Acad. Press, New-York (1963).
21. SCHULTZMANN, R.L., BARTHEL, W.F., J. Ass. Offic. and Anal. Chemists, 52, 151 (1969).

22. ACKERMANN, H., Arch. Toxikol., 24, 325 (1969).
23. BEAM, J.E., HANKINSON, D.J., J. Dairy Sci., 47, 1297 (1964).
24. VILLENEUVE, D.C., BUTTERFIELD, A.G., McCULLY, K.A., Bull. Environm. Contam. Toxicol., 4, 232 (1969).
25. DIXON, G.H., NEURATH, H., RECHERE, J.F., Ann. Rev. Biochem., 27, 489 (1958).
26. RUZICKA, J.H., THOMSON, J., WHEALS, B.B., J. Chromatography, 31, 37 (1967).
27. GINJAAR, L., VEL, S., Rec. Trav. Chim., 77, 956 (1958).
28. VOSS, G., J. Ass. Offic. and Anal. Chemists, 52, 1027 (1969).
29. DOSTROVSKY, I., HALMANN, M., J. Chem. Soc., 1956, 1004 (1956).
30. DIGGLE, W.M., GAGE, J.C., Biochem. J., 49, 491 (1951).
31. FUJITA, T., IWASA, J., HANSCH, C., J. Amer. Chem. Soc., 86, 5175 (1964).
32. BEROZA, M., INSCOE, M.N., BOWMAN, M.C., Residue Reviews, 30, 1 (1969).
33. HANSCH, C., DEUTSCH, E.W., Biochim. Biophys. Acta, 126, 117 (1966).
34. JAGLAN, P.S., GUNTHER, F.A., Analyst, 95, 763 (1970).
35. HOLLINGWORTH, R.M., Ph.D. Dissertation, Univ. California, Riverside, California (1966).
36. BOYCE, C.B.C., MILBORROW, B.V., Nature, 208, 537 (1965).
37. BATE-SMITH, E.C., WESTALL, R.G., Biochim. Biophys. Acta, 4, 427 (1950).
38. MARTIN, A.J.P., Biochem. Soc. Symp. Camb., 3, 4 (1949).
39. STAHL, E., in "Thin-layer Chromatography", Academic Press, London (1965).
40. DRABER, W., BÜCHEL, K.H., DICKORÉ, K., Proc. Int. Congr. Pestic. Chem., 2^o, 1971, vol. 5, p. 153 (1972).
41. ENDRES, H., HÖRMANN, H., Angew. Chem. 75, 288 (1963).
42. ENDRES, H., Z. Anal. Chem., 181, 391 (1961).
43. COLLANDER, R., Physiol. Plant., 7, 420 (1954).
44. CLIFFORD, D.R., WATKINS, D.A.M., Pestic. Sci., 2, 41 (1971).
45. McREYNOLDS, W.O., J. Chrom. Sci., 8, 214 (1970).
46. DALE, H.H., J. Pharmac. exp. Ther., 6, 147 (1914).
47. ENGELHARDT, E., LOWEI, O., Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmac., 150, 1 (1930).
48. ALDRIAN, E.D., FELDBERG, W., KILBY, B.K., Br. J. Pharmac. Chemother., 2, 56 (1947).

49. METCALF, R.L., MARCH, R.B., J. Econ. Entomol., 42, 721 (1949).
50. ALDRIDGE, W.N., REINER, E., in "Enzyme Inhibitors as substrates", North-Holland Publishing Cy, Amsterdam (1972).
51. AUGUSTINSSON, K.-B., Bull. W.H.O., 44, 81 (1971).
52. AUGUSTINSSON, K.-B., in "Homologous enzymes and biochemical evolution", Paris, NATO advanced Study Group, p. 299 (1968).
53. O'BRIEN, R.D., "Toxic phosphorus esters", Academic Press, New York (1960).
54. FUKUTO, T.R., "Advances in pest control research", Vol. 1, Interscience, New York (1957).
55. KRUPKA, R.M., Canad. J. Biochem., 42, 677 (1964).
56. ALDRIDGE, W.N., Biochem.J., 46, 451 (1950).
57. STEDMAN, E., STEDMAN, E., WHITE, A.C., Biochem. J., 27, 1055 (1933).
58. MENDEL, B., RUDNEY, H., Science, 98, 201 (1943).
59. MICHEL, H.O., J. Lab. Clin. Med., 34, 1564 (1949).
60. KALOW, W., GENEST, K., Can. J. Biochem. Physiol., 35, 339 (1957).
61. REINHOLD, J.G., TOURIGNY, G.L., YONAN, U.L., Am. J. Clin. Path., 23, 645 (1953).
62. GERARD, H.W., HUTCHISON, E., LOCHER, K.A., GOLZ, H.H., J. Occup. Med., 7, 303 (1965).
63. FLEISHER, J.H., WOODSON, G.S., SIMET, L., Arch. Industr. Hlth, 14, 510 (1956).
64. MAIN, A.R., MILES, K.A., BRAID, P.E., Biochem., 78, 769 (1969).
65. MORROW, A.C., MOTULSKY, A.G., J. Lab. Clin. Chem., 71, 350 (1968).
66. ELLMAN, G.L., COURTNEY, D., ANDRES, V., FEATHERSTONE, R., Biochem. Pharmacol., 7, 88 (1961).
67. REY, A., HANSS, M., Clin. Chim. Acta, 30, 207 (1970).
68. VAN HOODONCK, C., DE BORST, C., MITZKA, F.A., GROSS, C.C., Anal. Biochem., 48, 33 (1972).
69. BAUM, G., WARD, F.B., YAVERBAUM, S., Clin. Chim. Acta, 36, 405 (1972).
70. CRANMER, M.F., PEOPLE, A., J. Chromatogr., 57, 365 (1971).
71. WEBER, H., Dtsch. med. Wschr., 9, 1927 (1966).
72. VAN ASSCHE, R., Procida S.A., Marseille, persoonlijke mededeling.

73. WINTER, G.D., Ann. New York Acad. Sci., 87, 875 (1960).
74. VOSS, G., GEISSBÜHLER, H., Meded. Rijksfac. Landbouwwet. Gent., 32, 877 (1967).
75. GADDEIM, J.H., "Methods of Biological Assay Depending on a Quantal Response", Medical Research Council, Special Report Series, N° 183, London, 1933.
73. FINNEY, D.J., "Probit Analysis", Cambridge University Press, London, 1952.
77. VERLOOP, A., in "Drug Design", Ed. E.J. Ariëns, Vol. 3, Acad. Press, New York, 1972.
78. HANSCH, C., in "Drug Design", Ed. E.J. Ariëns, Vol. 1, Acad. Press, New York, 1971.
79. HANSCH, C., FUJITA, T., J. Amer. Chem. Soc., 86, 1616 (1964).
80. PENNISTON, J.T., BECKETT, L., BENTLEY, D.L., HANSCH, C., Mol. Pharmac., 5, 333 (1969).
81. McFARLAND, J.W., J. Med. Chem., 13, 1192 (1970).
82. PATON, W.D.M., RANG, H.P., Proc.R. Soc. (B), 163, 1 (1965)
83. HANSCH, C., "Annual Reports" in : Med. Chem., 1966, 347 (1966).
84. SYRKIN, Y.K., DYATKINA, M.E., "Structure of Molecules and the Chemical Bond", Dover Publications, Inc., New York, 1964, p. 262
85. TAFT, R.W., in "Steric Effects in Organic Chemistry", Ed. M.S. Newman, Wiley, New York, 1956, p. 556.
86. HANSCH, C., LEO, A., UNGER, S.H., KIM, K.H., NIKAITANI, D., LIEN, E.J., J. Med. Chem., 16, 1207 (1973).
87. HAMMETT, L.P., "Physical Organic Chemistry", McGraw-Hill, New York, 1950.
88. SINGER, J.A., PURCELL, W.P., THOMPSON, C.C., J. Med. Chem., 10, 528 (1967).
89. CAMMERATA, A., J. Med. Chem., 10, 525 (1967).
90. VAN BEKKUM, H., VERKADE, P.E., WEPSTER, B.M., Rec. Trav. Chem., 78, 815 (1959).
91. JAFFÉ, H.H., Chem. Rev., 53, 191 (1953).
92. BROWN, H.C., OHAMOTO, Y., J. Amer. Chem. Soc., 80, 4979 (1958).
93. TAFT, R.W., J. Phys. Chem., 64, 1805 (1960).
94. ROBERTS, J.D., MORELAND, W.T., J. Amer. Chem. Soc., 75, 2167 (1953).
95. YAMAMOTO, T., OTSU, T., Chem. Ind. (London), 1967, 787 (1967).

96. SWAIN, C.G., LUPTON, E.C., J. Amer. Chem. Soc., 90, 4328 (1968).
97. SETH-PAUL, W.A., VAN DUYSE, A., Spectrochim. Acta, Part A, 28, 211 (1972).
98. MEYER, K.H., HEMMI, H., Biochem. Z., 277, 39 (1935).
99. OVERTON, E., Z. Phys. Chem., 22, 189 (1897).
100. LEO, A., HANSCH, C., CHURCH, C., J. Med. Chem., 12, 766 (1969).
101. CHARTON, M., J. Amer. Chem. Soc., 91, 624 en 6649 (1969).
102. DRAPER, N.R., SMITH, H., "Applied Regression Analysis", Wiley, New York, 1966.
103. BRUICE, T.C., KHARASCH, N., WINZLER, R.J., Arch. Biochim. Biophys., 62, 305 (1956).
104. FREE, S.F., WILSON, J.W., J. Med. Chem., 7, 395 (1964).
105. CRAIG, P.N., Advances in Chemistry Series, 114, 115 (1972).
106. CAMMARATA, A., Ann. Rept. Med. Chem., 1970, 245 (1971).
107. SCHIFF, L.I., "Quantum Mechanics", McGraw-Hill, New York, 1955.
108. MARGENAU, H., MURPHY, G.M., "The Mathematics of Physics and Chemistry", Van Nostrand, Princeton, N.J., 1956.
109. ROTHMAN, C.C.J., BAGUS, P.S., in "Methods in Computational Physics", B. Alder, S. Fernbach, M. Rotenberg, eds., Vol. II, Academic Press, New York, 1963.
110. HUCKEL, E., Z. Phys., 76, 628 (1932).
111. KIER, L.B., "Molecular Orbital Theory in Drug Research", Acad. Press, New York (1971).
112. PARISER, R., PARR, R.G., J. Chem. Phys., 21, 466, 767 (1953).
113. POPL, J.A., Trans. Faraday Soc., 49, 1375 (1953).
114. GLADNEY, H.M., Quantum Chemistry Program Exchange, Indiana University, Bloomington, U.S.A.
115. FLURRY, R.L., BELL, J.J., Theor. Chim. Acta, 10, 1 (1968).
116. HOFFMANN, R., J. Chem. Phys., 39, 1397 (1963).
117. POPL, J.A., SANTRY, D.P., SEGAL, G.A., J. Chem. Phys., 43, S129, S136 (1965).
118. Quantum Chemical Program Exchange : CNINDO ~~141~~, Chem. Dept. Rm. 204, Indiana University, Bloomington, Indiana 47401, U.S.A.
119. KIER, L.B., Mol. Pharmacol., 3, 487 (1967).
120. CANEPA, F.G., PAULING, P., SÖRUM, H., Nature, 210, 207 (1966).

121. BALLY, R., Acta Cryst., B26, 477 (1970).
122. BAUGHMAN, R.G., JACOBSON, R.A., J. Agric. Food Chem., 23, 811 (1975).
123. SUTTON, L.E., "Tables of Interatomic Distances and Configuration in Molecules and Ions", The Chemical Society (London), 1958 .
124. CHRISTIAN, G.D., PURDY, W.C., J. Electroanal. Chem., 3, 363 (1962).
125. VOSS, G., J. Ass. Off. Anal. Chem., 52, 1027 (1969).
126. ABBOTT, W.S., J. Econ. Entomol., 18, 265 (1925).